



Phospholipides bio-sourcés riches en acides gras oméga 3 pour la formulation de liposomes

Tiphaine Bardeau

► To cite this version:

Tiphaine Bardeau. Phospholipides bio-sourcés riches en acides gras oméga 3 pour la formulation de liposomes. Génie des procédés. Université de Bordeaux, 2015. Français. NNT : 2015BORD0376 . tel-01298731

HAL Id: tel-01298731

<https://theses.hal.science/tel-01298731>

Submitted on 6 Apr 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
**DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

SPÉCIALITÉ : Génie des procédés

Par Tiphaine BARDEAU

**Phospholipides bio-sourcés riches en acides gras oméga 3
pour la formulation de liposomes**

Sous la direction de : Maud CANSELL
co-directrice : Pascale SUBRA-PATERNAULT

Soutenue le 11 décembre 2015

Soumis à l'avis des rapporteurs :

| | |
|---------------------------|--|
| Mme C. FAURE, | <i>Professeur, Bordeaux INP, Bordeaux</i> |
| Mme D. BARTH, | <i>Professeur, ENSIC, Nancy</i> |
| M. M. LAGARDE, | <i>Professeur, Université de Lyon, Lyon</i> |
| M. F. JOFFRE, | <i>Responsable développement analytique, Iterg, Pessac</i> |
| Mme M. CANSELL, | <i>Professeur, Bordeaux INP, Bordeaux</i> |
| Mme. P. SUBRA-PATERNAULT, | <i>Directrice de Recherche, CNRS, Bordeaux</i> |

| |
|------------------------|
| Président |
| Rapporteur |
| Rapporteur |
| Examineur |
| Directrice de thèse |
| Co-directrice de thèse |

- Remerciements -

« Si vous voulez que la vie vous sourie,
apportez-lui d'abord votre bonne humeur »
Spinoza

Cette thèse constitue une riche expérience qui ne peut s'achever sans remercier les personnes qui m'ont encadrée, aidée et soutenue au cours de ces trois années de recherches scientifiques. Je m'excuse d'avance si certains prénoms manquent dans ces pages, mais quel exercice difficile de remercier l'ensemble des personnes rencontrées sur cette période.

Mes premiers remerciements vont vers mes directrices de thèse, Maud Cansell et Pascale Subra-Paternault, sans qui cela n'aurait jamais été possible. J'exprime dans ces pages ma grande gratitude à toutes les deux pour m'avoir acceptée en thèse, d'avoir cru en moi et de m'avoir poussée dans mes retranchements même si cela a contribué à un budget mouchoir conséquent. Maud, même si cela fut compliqué entre nous deux, sache que j'ai énormément appris auprès de toi et que je n'oublierai pas ces heures où tu t'es acharnée pour que je comprenne la rigueur scientifique. Je remercie également l'Agence Nationale de la Recherche Technologique pour le financement de mon sujet de recherche.

J'exprime également tous mes remerciements à l'ensemble des membres de mon jury : Danielle Barth et Michel Lagarde d'avoir bien voulu être rapporteurs de mes travaux, Florent Joffre et Chrystel Faure d'avoir accepté d'examiner mon travail.

Je tiens aussi à traduire ici toute ma gratitude aux différents collaborateurs de mon projet : à Axelle et Estelle, ce fut un réel plaisir pour moi de venir et de travailler dans la bonne humeur sur la plateforme RMN ; à Corinne, merci beaucoup pour ta patience lors des cours particuliers que tu m'as prodigués sur la spectrométrie de masse ; à Sonia, pour nos longues discussions téléphoniques sur les résultats de LC-DEDL, puis les autres « Parisiens » Pierre, Audrey et Didier. Merci encore pour votre aide sur le projet. Mes remerciements vont aussi vers tout le personnel de la plateforme AGIR, qui ont rendu l'ensemble de mes passages très agréables, notamment toi mon petit Mathieu.

Mes remerciements vont également à Julien Monteil. Sous tes airs ronchons se cache quelqu'un de toujours disponible pour nous aider et nous soutenir quand on débarque dans ton bureau pour une séance de psychologie même un vendredi soir.

Je ne vous oublie pas non plus les filles, Clémence et Emilie. Nos conversations dans la fameuse salle supercritique où l'on refait le monde me manqueront soyez en sûre, Sans vous et votre soutien, ces années auraient été fades. Je n'oublie pas non plus les gens qui sont partis avant nous vers d'autres horizons, Alexandre le sportif de l'open space, Alexis le roi du selfie et Grégoire le champion de la coupe de ... saucissons. Bien entendu ces départs ont été accompagnés d'arrivées. Laurence, merci encore pour tes relectures et ton pointeur le jour J. Christelle Fleury, mon tour de hanches ne te remercie pas de ces innombrables délicieux gâteaux que tu fais chaque semaine...

Je remercie aussi le reste de l'équipe Clip'in Raphaëlle, Christelle, Hadj, Fernando, Claude, Patrick, Merian. Je remercie aussi Annelise pour ta joie de vivre et ton goût du sport, Elise, Marion,

Laëtitia, Sylvie, Céline et toutes les autres personnes du CBMN que j'ai côtoyées pendant ces années de thèse.

Enfin je remercie avec grande émotion ma famille pour son irremplaçable et inconditionnel soutien. Elle m'a toujours encouragée à aller de l'avant dans la vie. Merci aussi à mon chéri pour me permettre d'être si épanouie aujourd'hui. Je suis enfin arrivée au bout de cet exercice. Mais quelqu'un manque dans ces pages comme dans ma vie, merci à toi Maman, je sais à quel point tu aurais été fière de ta fille chérie.

Sommaire

| | |
|--|----|
| - REMERCIEMENTS - | 2 |
| - LISTE DES FIGURES - | 10 |
| - LISTE DES TABLEAUX - | 14 |
| - ABREVIATIONS - | 18 |
| <i>INTRODUCTION GENERALE</i> | 22 |
| CHAPITRE 1 : <i>DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES</i> | 26 |
| I. LECITHINES, PHOSPHOLIPIDES ET LEURS MODES D'EXTRACTION | 28 |
| I.1 PHOSPHOLIPIDES | 28 |
| I.2 DOMAINES D'APPLICATION DES LECITHINES | 31 |
| I.3 EXTRACTION INDUSTRIELLE DES LECITHINES | 32 |
| I.3.1 Extraction des lécithines végétales | 32 |
| I.3.2 Extraction de la lécithine d'œuf | 33 |
| I.3.3 Extraction de la lécithine marine | 35 |
| II. EXTRACTION DES LIPIDES PAR FLUIDE SUPERCRITIQUE | 36 |
| II.1 DEFINITIONS ET PROPRIETES | 37 |
| II.2 LE DIOXYDE DE CARBONE SUPERCRITIQUE (CO ₂ -SC) | 38 |
| II.2.1 Extraction des lipides totaux par le dioxyde de carbone supercritique | 38 |
| II.2.2 Extraction des phospholipides par CO ₂ supercritique avec ou sans co-solvant | 43 |
| III. LIPOSOMES/ETHOSOMES | 48 |
| III.1 DEFINITION ET APPLICATION DES LIPOSOMES | 48 |
| III.1.1 Vésicule lipidique ou liposome | 48 |
| III.1.2 Applications des liposomes | 49 |
| III.2 ETHOSOMES | 51 |
| III.3 METHODES DE PREPARATION DES LIPOSOMES | 52 |
| IV. OBJECTIFS DE LA THESE | 56 |

| | |
|--|-----------|
| CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES..... | 58 |
| I. MATERIEL | 60 |
| I.1 MATERIELS VEGETAUX ET ANIMAUX..... | 60 |
| I.1.1 Tourteaux d'oléagineux | 60 |
| I.1.2 Sous-produits de la coquille Saint Jacques | 60 |
| I.2 LIPIDES DE REFERENCE | 62 |
| I.2.1 Lipides | 62 |
| I.2.2 Lécithines | 63 |
| I.3 AUTRES PRODUITS | 64 |
| II. EXTRACTION PAR FLUIDE SUPERCRITIQUE | 66 |
| II.1 DISPOSITIF EXPERIMENTAL | 66 |
| II.1.1 Description du montage | 66 |
| II.1.2 Préparation des échantillons | 67 |
| II.1.2 Remplissage du réacteur | 68 |
| II.2 PROTOCOLES ET CONDITIONS OPERATOIRES..... | 68 |
| II.3 CARACTERISATION DES EXTRACTIONS..... | 71 |
| III. CARACTERISATION DES MATRICES ET DES EXTRAITS SUPERCRITIQUES | 72 |
| III.1 TENEUR EN EAU DES MATRICES..... | 72 |
| III.2 TENEUR EN LIPIDES TOTAUX DES MATRICES, DES RESIDUS ET DES FRACTIONS ISSUES DES EXTRACTIONS PAR FLUIDE SUPERCRITIQUE | 72 |
| III.3 SEPARATION ET PURIFICATION DES FRACTIONS LIPIDIQUES PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE | 74 |
| III.3.1 Séparation des lipides par chromatographie sur couche mince | 74 |
| III.3.2 Extraction des phospholipides du gel de silice | 75 |
| III.4 CARACTERISATION DES PHOSPHOLIPIDES DES MATRICES ET DES FRACTIONS ISSUES DES EXTRACTIONS PAR FLUIDE SUPERCRITIQUE | 75 |
| III.4.1 Dosage colorimétrique du phosphore | 75 |
| III.4.2 Résonance Magnétique Nucléaire du phosphore 31 | 76 |
| III.4.3 Spectrométrie de masse | 79 |
| III.5 ANALYSE ET QUANTIFICATION DES LIPIDES PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE COUPLEE AU DETECTEUR EVAPORATIF A DIFFUSION DE LUMIERE (S. ABREU, LYP(SYS)²) | 83 |

| | |
|---|------------|
| III.6 ANALYSE DES ACIDES GRAS DES LIPIDES TOTAUX ET DES PHOSPHOLIPIDES TOTAUX DES MATRICES | 85 |
| III.6.1 Quantification des acides gras polyinsaturés n-3 par RMN du proton | 85 |
| III.6.2 Analyse des acides gras par chromatographie en phase gazeuse | 86 |
| IV. PREPARATION ET CARACTERISATION DES LIPOSOMES / ETHOSOMES | 89 |
| IV.1 PREPARATION DES LIPOSOMES/ETHOSOMES..... | 89 |
| IV.1.1 Liposomes | 89 |
| IV.1.2 Ethosomes | 89 |
| IV.2 CARACTERISATION DES LIPOSOMES/ETHOSOMES..... | 91 |
| IV.2.1 Microscopie optique à contraste interférentiel différentiel | 91 |
| IV.2.2 Diffusion dynamique de la lumière | 91 |
| IV.2.3 Zétamétrie | 91 |
| V. TRAITEMENT STATISTIQUE DES DONNEES | 92 |
| CHAPITRE 3 : RESULTATS ET DISCUSSION..... | 94 |
| I. CARACTERISATION DES MATRICES VEGETALES ET ANIMALE..... | 96 |
| I.1 GENERALITES SUR LES OLEAGINEUX ETUDIES | 96 |
| I.1.1 La cameline (<i>Camelina sativa</i>)..... | 96 |
| I.1.2 Le lin (<i>Linum usitatissimum</i> L.)..... | 102 |
| I.1.3 Le chanvre (<i>Cannabis sativa</i> L.) | 106 |
| I.1.4 Le sésame (<i>Sesamum indicum</i> L.) | 110 |
| I.1.5 La noix (<i>Juglans regia</i>) | 114 |
| I.2 MISE AU POINT DES TECHNIQUES ANALYTIQUES..... | 119 |
| I.2.1 Analyse des acides gras des lipides totaux et des phospholipides | 120 |
| I.2.2 Quantification des classes de lipides par LC-DEDL | 121 |
| I.2.3 Quantification des classes de phospholipides | 122 |
| I.3 CARACTERISATION DES LIPIDES TOTAUX DES SOURCES VEGETALES | 125 |
| I.3.1 Teneur en lipides totaux | 125 |
| I.3.2 Composition en acides gras des lipides totaux | 126 |
| I.3.3 Quantification des classes de lipides neutres et des acides gras libres | 128 |
| I.3.4 CARACTERISATION DES PHOSPHOLIPIDES | 130 |
| I.4 COMPOSITION EN LIPIDES DES SOUS-PRODUITS DE LA COQUILLE SAINT JACQUES.. | 135 |
| I.4.1 Quantification et identification des lipides totaux | 136 |
| I.4.2 Classes de lipides phosphorés..... | 137 |
| I.4.3 Composition en acides gras des lipides totaux et des lipides phosphorés | 138 |
| I.5 CONCLUSION | 140 |

| | | |
|-------------|--|------------|
| II. | EXTRACTION DES PHOSPHOLIPIDES PAR VOIE SUPERCRITIQUE | 141 |
| II.1 | PLANS DES ESSAIS ET PARAMETRES ETUDIES..... | 141 |
| II.2 | INFLUENCE DU POURCENTAGE D'ETHANOL POUR L'EXTRACTION DES PHOSPHOLIPIDES | 145 |
| II.2.1 | Validation du protocole d'extraction | 145 |
| II.2.2 | Extraction à teneur fixe en éthanol..... | 147 |
| II.2.3 | Pureté en lipides totaux et en phospholipides des fractions supercritiques | 150 |
| II.2.4 | Conclusion de l'extraction à taux fixe d'éthanol..... | 157 |
| II.3 | EXTRACTION DES PHOSPHOLIPIDES AVEC GRADIENT D'ETHANOL ET LE REACTEUR DE 100 mL..... | 158 |
| II.3.1 | Reproductibilité des extractions..... | 158 |
| II.3.2 | Influence du gradient d'éthanol sur l'extraction et la pureté des phospholipides | 160 |
| II.3.3 | Influence de différents paramètres opératoires autres que l'éthanol sur l'extraction des PL | 165 |
| II.4 | TRANSPOSITION DE L'EXTRACTION DES PHOSPHOLIPIDES DANS UN REACTEUR TUBULAIRE DE 490 mL | 167 |
| II.4.1 | Extraction à partir d'une même quantité de charge | 167 |
| II.4.2 | Influence de la masse introduite..... | 171 |
| II.4.3 | Extraction sur d'autres tourteaux que le tourteau de cameline | 175 |
| II.5 | ANALYSES DES LIPIDES EXTRAITS | 179 |
| II.5.1 | Analyse des classes de lipides présentes dans les fractions | 179 |
| II.5.2 | Classes de phospholipides dans les fractions | 184 |
| II.5.3 | Composition en acides gras des fractions huileuses de F0 | 185 |
| II.6 | CONCLUSION..... | 186 |
| III. | FORMULATION ET CARACTERISATION DE LIPOSOMES ET D'ETHOSOMES | 188 |
| III.1 | ETUDE PRELIMINAIRE : FORMATION ET CARACTERISATION DE LIPOSOMES A PARTIR DE LECITHINES COMMERCIALES | 188 |
| III.1.1 | Influence de la concentration finale en lécithine sur les caractéristiques des liposomes | 188 |
| III.1.2 | Influence de la composition de la lécithine sur les caractéristiques des liposomes | 189 |
| III.2 | ETUDE PRELIMINAIRE : FORMATION ET CARACTERISATION D'ETHOSOMES A PARTIR DE LECITHINES COMMERCIALES | 190 |
| III.2.1 | Influence de la concentration initiale en lécithine sur les caractéristiques des éthosomes..... | 191 |
| III.2.2 | Influence du taux d'éthanol sur les caractéristiques des éthosomes | 191 |
| III.2.3 | Influence du débit d'eau sur la morphologie des éthosomes | 192 |

| | |
|--|------------|
| III.2.4 Influence de la composition de la lécithine sur la morphologie des éthosomes | 193 |
| III.3 FORMATION DE LIPOSOMES ET ETHOSOMES A PARTIR D'EXTRAITS OBTENUS PAR VOIE SUPERCRITIQUE | 194 |
| III.3.1 Influence de la composition des extraits supercritiques sur les caractéristiques des liposomes | 194 |
| III.3.2 Caractéristique des éthosomes préparés à partir des extraits supercritiques | 195 |
| III.3.4 Comparaison des caractéristiques des liposomes et des éthosomes (à 20% d'éthanol) préparés à partir d'une même fraction supercritique..... | 196 |
| CONCLUSION ET PERSPECTIVES | 198 |
| REFERENCES | 204 |
| ANNEXES..... | 220 |

- Liste des figures -

Chapitre 1 : Données bibliographiques

| | |
|--|----|
| Figure 1.1 : Structure chimique des principaux lipides phosphorés..... | 28 |
| Figure 1.2 : Transformations possibles d'une lécithine brute (Guo et al., 2005)..... | 33 |
| Figure 1.3 : Protocoles possibles pour l'extraction industrielle de la lécithine d'œuf (Palacios and Wang, 2005)..... | 34 |
| Figure 1.4 : Extraction industrielle de la lécithine marine (Ifremer, 2010)..... | 35 |
| Figure 1.5 : Bibliographie relative à l'utilisation des fluides supercritiques. A : Nombre de brevets déposés sur les fluides supercritiques répertoriés par domaine d'activité ; B : Nombre de publications sur l'extraction par fluide supercritique (Schütz, 2007 et données extraites de Scopus)..... | 36 |
| Figure 1.6 : Diagramme de phase d'un corps pur : exemple du dioxyde de carbone (CO ₂) (Figure adaptée de Brunner, 2005)..... | 37 |
| Figure 1.7 : Influence de la pression et de la température sur la densité du fluide (A) et sur la solubilisation d'une huile extraite de colza (B) (Fattori et al., 1988). | 38 |
| Figure 1.8 : Effet de la pression et de la température sur la solubilité de l'huile extraite de <i>Moringa oleifera</i> (Zhao and Zhang, 2014)..... | 41 |
| Figure 1.9 : Influence de la longueur de la chaîne d'acides gras lors de l'extraction par CO ₂ supercritique. A : Expérience réalisée à partir de triglycérides homogènes à 40°C (Hammam, 1992) ; B : Composition en acides gras d'une huile de palme commerciale et d'une huile de palme extraite par CO ₂ supercritiques obtenus à 80°C, à faible et haute pression (Zaidul et al., 2007)..... | 42 |
| Figure 1.10 : Schéma d'un liposome et classification (adapté de Dua et al., 2012 et Lorin et al., 2004)..... | 49 |
| Figure 1.11 : Différentes couches de la peau et détail du stratum corneum. | 51 |
| Figure 1.12 : Techniques conventionnelles de formation des liposomes. A : par formation d'un film phospholipidique et hydratation ; B : par émulsion et évaporation du solvant ; C : par élimination du détergent ; D : par injection de solvant (Walde and Ichikawa, 2001). | 53 |

Chapitre 2 : Matériels et méthodes

| | |
|--|----|
| Figure 2.1 : Protocole de conditionnement des sous-produits de la coquille Saint Jacques..... | 61 |
| Figure 2.2 : Zéodrateur et principe de la zéodratation (Marin and René, 2000)..... | 62 |
| Figure 2.3 : Montage expérimental (A) et schéma (B) de l'extraction par fluide supercritique...67 | |
| Figure 2.4 : Types de fractions collectées au cours de l'extraction à partir de tourteaux végétaux. A : fraction biphasique avec une phase plus dense (phase huileuse) et une phase éthanolique (EFS Cameline 2 F0) ; B : fraction constituée essentiellement de solution éthanolique (EFS Cameline 2 F2)..... | 73 |

| | |
|---|----|
| Figure 2.5 : Application d'un champ magnétique B_0 | 76 |
| Figure 2.6 : Perturbation et relaxation du moment magnétique..... | 77 |
| Figure 2.7 : Spectromètre de masse et son principe dans la fragmentation des phospholipides..... | 80 |
| Figure 2.8 : Spectre RMN 1H obtenu à partir des lipides totaux du tourteau de cameline Bioplanète..... | 86 |

Chapitre 3 : Résultats et discussion

| | |
|---|-----|
| Figure 3.1 : Fleurs et graines de cameline..... | 97 |
| Figure 3.2 : Fleurs et graines de lin..... | 102 |
| Figure 3.3 : Fleurs et graines de chanvre..... | 107 |
| Figure 3.4 : Fleurs et graines de sésame..... | 111 |
| Figure 3.5 : Arbre de la noix et la noix..... | 115 |
| Figure 3.6 : Chromatogrammes des lipides totaux des cinq tourteaux Bioplanète obtenus par LC-DEDL..... | 128 |
| Figure 3.7 : Composition moléculaire des principaux phospholipides présents dans les tourteaux de cameline (■), lin (■), chanvre (■), sésame (■) et noix (□), obtenu par LC-MS en phase normale. Espèces moléculaires de A : acide phosphatidique (PA) ; B : phosphatidylcholine (PC) ; C : phosphatidyléthanolamine (PE) ; D : phosphatidylinositol (PI)..... | 135 |
| Figure 3.8 : Fractions F0 obtenues lors d'une extraction avec gradient d'éthanol dans le réacteur de 100 mL à partir de la coquille Saint Jacques (EFS St Jacques 13, débit $CO_2 = 7,9 \text{ g.min}^{-1}$) (A) et à partir de la cameline Iterg (EFS Cameline 20 F0, débit $CO_2 = 6,7 \text{ g.min}^{-1}$) (B)..... | 142 |
| Figure 3.9 : Reproductibilité de l'extraction à taux fixe d'éthanol (15%mass EtOH) dans le réacteur de 100 mL à partir de la coquille Saint Jacques P = 25 MPa, T = 45°C, (EFS St Jacques 8 : débit $CO_2 = 6,7 \text{ g.min}^{-1}$, débit d'éthanol = 1,1 g.min^{-1} ; EFS St Jacques 9 : débit $CO_2 = 6,5 \text{ g.min}^{-1}$, débit d'éthanol = 1,1 g.min^{-1})..... | 145 |
| Figure 3.10 : Aspect macroscopique du résidu de cameline à la sortie du réacteur en présence (A) et en absence d'éthanol (B) lors de l'extraction supercritique..... | 147 |
| Figure 3.11 : Cinétique d'extraction à pourcentage d'éthanol fixe dans le fluide supercritique à partir du tourteau de cameline Bioplanète (A) et des sous-produits de la coquille Saint Jacques (B), dans le réacteur de 100 mL ($m_{\text{chargée}} = 52,5 \text{ à } 60,0 \text{ g}$ pour le tourteau de cameline, $m_{\text{chargée}} = 33,0 \text{ à } 37,0 \text{ g}$ pour la coquille Saint Jacques, débit $CO_2 = 6,3 \pm 0,5 \text{ g.min}^{-1}$)..... | 148 |
| Figure 3.12 : Rendement d'extraction global, en lipides totaux et en phospholipides obtenus à partir d'extraction à pourcentage fixe d'éthanol pour la cameline Bioplanète (A) et la coquille Saint Jacques (B) ($m_{\text{chargée}} = 52,5 \text{ à } 60,0 \text{ g}$ pour le tourteau de cameline, $m_{\text{chargée}} = 33,0 \text{ à } 37 \text{ g}$ pour la coquille Saint Jacques, débit $CO_2 = 6,3 \pm 0,5 \text{ g.min}^{-1}$)..... | 149 |
| Figure 3.13 : Répartition des lipides totaux et des phospholipides dans les fractions au cours de l'extraction : A : à 15% EtOH (EFS St Jacques 8, débit de $CO_2 = 6,7 \text{ g.min}^{-1}$) ; B : à 30% EtOH (EFS St Jacques 11, débit de $CO_2 = 6,5 \text{ g.min}^{-1}$) dans le réacteur de 100 mL..... | 151 |

Figure 3.14 : Répartition des lipides totaux et des phospholipides sur les premières fractions de l'extraction à 15% d'éthanol (A) (EFS Cameline 2, débit de CO₂ = 6,5 g.min⁻¹) et à 30% d'éthanol (B) (EFS Cameline 6, débit de CO₂ = 6,0 g.min⁻¹)..... 156

Figure 3.15 : Cinétique d'extraction obtenue à partir de la cameline Iterg (EFS Cameline 19, m_{chargée} = 46,4 g ; EFS Cameline 23, m_{chargée} = 43,2 g) (P = 25 MPa, T = 45°C, débit CO₂ = 7,0 ± 0,1 g.min⁻¹, n=2)..... 159

Figure 3.16 : Répartition des masses extraites dans les différentes fractions au cours d'une extraction avec gradient d'éthanol à partir du tourteau de cameline Bioplanète (P = 25 MPa, T = 45°C, débit CO₂ = 6,5 g.min⁻¹, EFS Cameline 10)..... 161

Figure 3.17 : Répartition des phospholipides dans les fractions F2 et F3 et dans le résidu au cours de l'extraction dans le réacteur de 100 mL (P = 25 MPa, T = 45°C, débit CO₂ = 7,0 ± 0,5 g.min⁻¹). A : cas du tourteau de cameline Bioplanète (EFS Cameline 10) ; B : cas du tourteau de cameline Iterg (EFS Cameline 18) ; C : cas des sous-produits de la coquille Saint Jacques (EFS St Jacques 13)..... 164

Figure 3.18 : Cinétique d'extraction pour une même masse chargée mais dans des réacteurs de volume différents (P = 25 MPa, T = 45°C). Réacteur de 100 mL : EFS Cameline 10, m_{chargée} = 55 g, débit CO₂ = 6,5 g.min⁻¹. Réacteur de 490 mL : EFS Cameline 11, m_{chargée} = 60 g, débit CO₂ = 12,3 g.min⁻¹. A : cinétique en fonction du temps ; B : cinétique en fonction de la masse de fluide..... 168

Figure 3.19 : Répartition des masses extraites dans les différentes fractions au cours d'une extraction par gradient à partir de cameline Bioplanète (P = 25 MPa, T = 45°C, EFS Cameline 11, m_{chargée} = 60,0 g, débit CO₂ = 12,3 g.min⁻¹, réacteur de 490 mL)..... 169

Figure 3.20 : Cinétique d'extraction de la matière totale, des lipides totaux (LT) et des phospholipides (PL) à partir des sous-produits de la coquille Saint Jacques (EFS St Jacques 7, P = 25 MPa, T = 45°C, débit CO₂ = 14,1 g.min⁻¹)..... 170

Figure 3.21 : Répartition des lipides totaux et des phospholipides lors d'une extraction par gradient à partir des sous-produits de la coquille Saint Jacques dans le réacteur de 490 mL (EFS Saint Jacques 7, m_{chargée} = 30,0 g ; débit CO₂ = 14,1 g.min⁻¹)..... 171

Figure 3.22 : Influence de la masse introduite sur l'extraction de la matière totale, des lipides totaux et des phospholipides avec le réacteur de 490 mL (P = 25 MPa, T = 45°C, débit CO₂ = 11,8 g.min⁻¹ (120g) et 12,3 g.min⁻¹ (pour 60g)) A : tourteau de cameline Bioplanète (EFS cameline 11 et EFS cameline 13) ; B : sous-produit de la coquille Saint Jacques (EFS St Jacques 7 débit CO₂ = 14 g.min⁻¹ et EFS St Jacques 5 débit CO₂ = 13,6 g.min⁻¹)..... 173

Figure 3.23 : Influence de la masse introduite sur l'extraction de la matière totale, des lipides totaux et des phospholipides avec le réacteur de 490 mL (P = 25 MPa, T = 45°C) A : tourteau de cameline Bioplanète (débit CO₂ = 11,8 g.min⁻¹ (120g) et 12,3 g.min⁻¹ (pour 60g)); B : sous-produit de la coquille Saint Jacques (débit CO₂ = 13,6 g.min⁻¹ (60g) et 14,1 g.min⁻¹ (pour 30g))..... 174

Figure 3.24 : Cinétiques d'extraction obtenues à partir de deux matrices oléagineuses différentes (A) et répartition de la matière lipidique non lipidique dans les fractions. B : Tourteau de sésame (EFS Sésame T3, débit CO₂ = 14,5 g.min⁻¹, taux fixe d'éthanol : 27%mass) ; C : Tourteau de lin (EFS Lin 3, débit CO₂ = 15,5 g.min⁻¹, taux fixe d'éthanol : 27%mass)..... 176

Figure 3.25 : Cinétique d'extraction et répartition des lipides lors de l'extraction par fluide supercritique avec gradient d'éthanol. A : Extraction réalisée à partir du tourteau de lin (EFS lin 4, réacteur de 490 mL, débit CO₂ = 15,5 g.min⁻¹, m_{chargée} = 35 g) ; B : Extraction réalisée à partir du tourteau de sésame (EFS Sésame T1, réacteur de 490 mL, débit CO₂ = 14,7 g.min⁻¹, m_{chargée} = 35 g)..... 178

Figure 3.26 : Classes de lipides présentes dans les fractions de EFS Cameline 18 par analyse LC-DEDL. A : Fractions éthanoliques zoom sur les lipides apolaires ; B : Fraction éthanoliques

zoom sur les lipides polaires, C : Comparaison de la phase éthanolique et de la phase huileuse de EFS Cameline 18 F0 ; D : Comparaison de la phase éthanolique et de la phase huileuse de EFS Cameline 18 F1..... 181

Figure 3.27 : Classes de lipides présentes dans les fractions EFS St Jacques 13 ; A : Zoom sur la partie apolaire ; B : Zoom sur la partie polaire.....183

Figure 3.28 : Spectre RMN ^{31}P de fractions supercritiques..... 185

- Liste des tableaux -

Chapitre 1 : Données bibliographiques

| | |
|---|----|
| Tableau 1.1 : Composition en phospholipides et en acides gras de différentes lécithines végétales (A) et animales (B). | 30 |
| Tableau 1.2 : Valeurs moyennes des rendements, de la pureté et du taux de récupération de la phosphatidylcholine (PC) (d'après Palacios and Wang, 2005)..... | 34 |
| Tableau 1.3 : Extraction par fluide supercritique des lipides à partir de différentes sources végétales et animales. A : publications rapportant la quantité de lipides totaux. B : publications analysant la composition de la fraction lipidique (adapté de la revue de Martínez and Carolina de Aguiar, 2014). | 39 |
| Tableau 1.4 : Présentation des différentes matrices, conditions opératoires appliquées et résultats de l'extraction des phospholipides par fluide supercritique avec l'utilisation d'un co-solvant. | 45 |

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

| | |
|--|----|
| Tableau 2.1 : Caractéristiques des tourteaux d'oléagineux (données fournisseur). | 60 |
| Tableau 2.2 : Caractéristiques des lipides utilisés. | 63 |
| Tableau 2.3 : Composition en lipides des lécithines commerciales utilisées et composition en acides gras majoritaires. | 64 |
| Tableau 2.4 : Provenance et grade des différents solvants et produits utilisés..... | 65 |
| Tableau 2.5 : Protocoles d'extraction appliqués selon la matrice étudiée et nombre de fractions récoltées. | 70 |
| Tableau 2.6 : Calculs de rendement et de pureté caractérisant les différentes extractions. | 72 |
| Tableau 2.7 : Composition des solvants de migration utilisés..... | 74 |
| Tableau 2.8 : Déplacement chimique de différentes classes de phospholipides par RMN ³¹ P... .. | 79 |
| Tableau 2.9 : Gradient d'élution appliqué en chromatographie liquide. | 82 |
| Tableau 2.10 : Gradient d'élution appliqué en chromatographie liquide en phase normale..... | 82 |
| Tableau 2.11 : Gradient d'élution (Gerits et al., 2013). | 84 |
| Tableau 2.12 : Nombre de caractérisations réalisées sur les différentes matrices. | 88 |
| Tableau 2.13 : Paramètres testés et nombre d'essais pour la préparation des liposomes/éthosomes à partir de lécithines commerciales (A) et de PL extraits par fluide supercritique (B). | 90 |
| Tableau 2.14 : Indice de réfraction des milieux de dispersion des liposomes/éthosomes (Kolodner et al., 1988). | 91 |

| | |
|--|----|
| Tableau 2.15 : Viscosité et constante diélectrique des milieux de dispersion des liposomes/éthosomes (à T=20°C) (d'après Khattab et al., 2012 et Åkerlöf, 1932)..... | 92 |
|--|----|

Chapitre 3 : Résultats et discussion

| | |
|--|-----|
| Tableau 3.1 : Principaux composés de la graine (A), de l'huile (B) et du tourteau de cameline (C)..... | 99 |
| Tableau 3.2 : Principaux composés de la graine (A), de l'huile (B) et du tourteau de lin (C). ... | 104 |
| Tableau 3.3 : Principaux composés de la graine (A), de l'huile (B) et du tourteau de chanvre (C). | 108 |
| Tableau 3.4 : Principaux composés de la graine (A), de l'huile (B) et du tourteau de sésame (C). | 112 |
| Tableau 3.5 : Principaux composés du fruit (A), de l'huile (B) et du tourteau de noix (C). | 116 |
| Tableau 3.6 : Composition en acides gras d'un mélange de phospholipides de référence par CPG et RMN ¹ H..... | 120 |
| Tableau 3.7 : Analyse de 12 mélanges de phospholipides par RMN ³¹ P, HPLC-MS en phase normale et phase inverse. | 124 |
| Tableau 3.8 : Taux d'extraction basé sur les teneurs des graines et de la noix trouvées dans la bibliographie. | 126 |
| Tableau 3.9 : Quantification des acides gras polyinsaturés n-3 des lipides totaux des tourteaux par RMN ¹ H..... | 126 |
| Tableau 3.10 : Composition en acides gras des lipides totaux des tourteaux végétaux déterminée par CPG..... | 127 |
| Tableau 3.11 : Identification des lipides des tourteaux végétaux par LC-DEDL et LC-MS ^a | 129 |
| Tableau 3.12 : Quantification des phospholipides des lipides totaux des tourteaux végétaux. | 130 |
| Tableau 3.13 : Quantité de phospholipides présente dans les tourteaux oléagineux. | 131 |
| Tableau 3.14 : Classes de phospholipides des lipides totaux extraits des tourteaux végétaux déterminées par RMN ³¹ P..... | 131 |
| Tableau 3.15 : Composition en acide gras (AG) des phospholipides extraits des lipides totaux des tourteaux. | 133 |
| Tableau 3.16 : Classes de lipides des sous-produits de la coquille Saint Jacques..... | 136 |
| Tableau 3.17 : Classes des phospholipides des sous-produits de la coquille Saint Jacques déterminées par RMN ³¹ P (Résultat obtenu à partir de deux extractions de LT indépendantes)..... | 137 |
| Tableau 3.18 : Composition en acides gras des lipides totaux et des lipides phosphorés des sous-produits de la coquille Saint Jacques, déterminée par CPG. | 139 |
| Tableau 3.19 : Pression/température appliquées pour l'extraction des lipides neutres et des phospholipides. | 141 |

| | |
|--|-----|
| Tableau 3.20 : Extractions par fluide supercritique : conditions opératoires et analyses des fractions (T = 45°C, P = 25 MPa, débit moyen de CO ₂ = 6,5 ± 0,5 g.min ⁻¹ pour le réacteur de 100 mL, débit moyen de CO ₂ = 14,0 ± 1,1 g.min ⁻¹ pour le réacteur de 490 mL, débit d'éthanol variable selon la composition du mélange souhaitée)..... | 143 |
| Tableau 3.21 : Reproductibilité des extractions à taux fixe d'éthanol dans le réacteur de 100 mL (Débit d'éthanol : 0,1 g.min ⁻¹ (2% EtOH), 1,2 g.min ⁻¹ (15% EtOH), 2,1 – 2,7 g.min ⁻¹ (30% EtOH), n=2). | 146 |
| Tableau 3.22 : Rendements en lipides totaux et en phospholipides des extractions (n=2). | 147 |
| Tableau 3.23 : Composition en phospholipides, en lipides non phosphorés et autres molécules non-lipidiques des fractions issues de l'extraction des sous-produits de la coquille Saint-Jacques. | 154 |
| Tableau 3.24 : Composition en PL, lipides non phosphorés et autres molécules non lipidiques dans les extractions à taux fixe d'éthanol à partir du tourteau cameline Bioplanète. | 157 |
| Tableau 3.25 : Répétabilité des extractions avec gradient d'éthanol (n=2, EFS Cameline 19 et EFS Cameline 23). A : Conditions opératoires de l'extraction et rendement global ; B : Masses et rendements d'extraction en lipides totaux et en phospholipides. | 160 |
| Tableau 3.26 : Pureté en phospholipides des fractions F2, F3 et F4 obtenues suite au protocole avec gradient d'éthanol à partir des trois matrices. | 163 |
| Tableau 3.27 : Rendements obtenus pour les extractions par fluide supercritique avec gradient d'éthanol dans le réacteur de 100 mL (P = 25 MPa, T = 45°C, débit CO ₂ = 7,0 ± 0,5 g.min ⁻¹)..... | 165 |
| Tableau 3.28 : Paramètres opératoires et rendements d'extraction à partir du tourteau de cameline Iterg (P = 25 MPa, T = 45°C, débit CO ₂ = 6,7 ± 0,5 g.min ⁻¹). A : Conditions opératoires de l'extraction et calcul du rendement global ; B : Masses et rendements d'extraction en lipides totaux et en phospholipides. | 166 |
| Tableau 3.29 : Rendements obtenus pour les extractions par fluide supercritique avec gradient d'éthanol dans les deux systèmes d'extraction (P = 25 MPa, T = 45°C). Réacteur de 100 mL : EFS Cameline 10, m_{chargée} = 55 g, débit CO₂ = 6,5 g.min⁻¹. Réacteur de 490 mL : EFS Cameline 11, m_{chargée} = 60 g, débit CO₂ = 12,3 g.min⁻¹. | 169 |
| Tableau 3.30 : Rendements obtenus pour les extractions par fluide supercritique avec gradient d'éthanol dans les deux réacteurs (P = 25 MPa, T = 45°C). Réacteur de 100 mL : EFS St Jacques 13, m_{chargée} = 32,8 g, débit CO₂ = 7,4 g.min⁻¹. Réacteur de 490 mL : EFS St Jacques 7, m_{chargée} = 30 g, débit CO₂ = 14,1 g.min⁻¹. | 171 |
| Tableau 3.31 : Estimation de la masse de fluide nécessaire à l'extraction des lipides en fonction de la charge, basée sur une solubilité d'huile d'environ 10 mg.g⁻¹ de fluide. | 172 |
| Tableau 3.32 : Rendements obtenus pour les extractions par fluide supercritique avec gradient d'éthanol dans le réacteur de 490 mL (P = 25 MPa, T = 45°C, débit CO ₂ = 13,0 ± 1,1 g.min ⁻¹). ... | 175 |
| Tableau 3.33 : Rendements d'extraction globale, en lipides totaux et en phospholipides à partir de deux tourteaux d'oléagineux en utilisant le réacteur de 490 mL. (P = 25 MPa, T = 45°C, débit CO ₂ = 13,0 ± 1,1 g.min ⁻¹ , masse chargée 35 g)..... | 177 |
| Tableau 3.34 : Rendements d'extraction global, en lipides totaux et en phospholipides à partir de deux tourteaux d'oléagineux en utilisant le réacteur de 490 mL (Temps d'extraction : 4h20, débit de CO ₂ = 15,5 g.min ⁻¹ pour le lin et de 14,7 g.min ⁻¹ pour le sésame, masse chargée 35 g). | 178 |
| Tableau 3.35 : Identification et quantification des classes de phospholipides analysés dans les fractions supercritiques (en gras, rappel des compositions en phospholipides des matrices initiales). | 184 |

| | |
|--|-----|
| Tableau 3.36 : Profil en acides gras des phases huileuses obtenues à partir de tourteaux d'oléagineux (EFS cameline 1, EFS cameline 2, EFS lin 1, EFS Lin2, EFS Sésame T1, EFS Sésame T2). | 186 |
| Tableau 3.37 : Influence de la concentration finale en lécithine sur les caractéristiques des liposomes à base de lécithine de soja (Lecisoya P97, débit d'eau : 4,1 mL.min ⁻¹). | 189 |
| Tableau 3.38 : Influence de la composition en lipides des lécithines sur le diamètre moyen et le potentiel zêta des liposomes (Lecisoya P97, Lipoïd P30 et LC 60, débit d'eau : 4,1 mL.min ⁻¹ , concentration finale en lécithine : 1 mg.mL ⁻¹). | 190 |
| Tableau 3.39 : Influence de la concentration initiale en lécithine de soja (Lecisoya P97) sur les caractéristiques des éthosomes (20%EtOH ; débit d'ajout d'eau de 4,1 mL.min ⁻¹). | 191 |
| Tableau 3.40 : Influence du taux d'éthanol sur les caractéristiques des éthosomes à base de lécithine de soja (Lecisoya P97 ; débit d'eau : 4,1 mL.min ⁻¹ ; concentration finale en PL : 1 mg.mL ⁻¹). | 192 |
| Tableau 3.41 : Influence du débit d'eau sur les caractéristiques des éthosomes à base de deux lécithines commerciales différentes (20%EtOH ; concentration finale en lécithine : 1 mg.mL ⁻¹)... | 193 |
| Tableau 3.42 : Pureté, concentration et composition en phospholipides de fractions obtenues par voie supercritique et utilisées pour la préparation des liposomes et éthosomes. | 194 |
| Tableau 3.43 : Influence de la teneur en phospholipides chargés sur les caractéristiques des liposomes (Extraits supercritiques, débit d'eau 4,1 mL.min ⁻¹ , [PL] _{finale} = 1 mg.mL ⁻¹). | 195 |
| Tableau 3.44 : Influence du débit d'eau sur les caractéristiques des éthosomes obtenus à partir de trois extraits supercritiques. | 195 |
| Tableau 3.45 : Comparaison des caractéristiques des liposomes et éthosomes (20%vol) basés sur des PL extraits par SC (débit d'eau : 4,1 mL.min ⁻¹). | 196 |

- Abréviations -

AG(L) : Acide gras (libre)
AGMI : Acide gras monoinsaturé
AGPI : Acide gras polyinsaturé
AGS : Acide gras saturé
ALA : Acide α -linolénique
ANR : Agence nationale de la recherche
APCI : Ionisation chimique à pression atmosphérique
 B_0 : Champ magnétique
 BF_3 : Trifluorure de bore
BHT : Hydroxytoluène butylé
CCM : Chromatographie sur couche mince
 $CDCl_3/MeOD$: Chloroforme deutéré / Méthanol deutéré
 $CHCl_3$: Chloroforme
Chol : Cholestérol
CL : Cardiolipine
 CO_2 -SC : Dioxyde de carbone supercritique
CPG : Chromatographie en phase gazeuse
DAG : Diacylglycérol (ou diglycéride)
DEDL : Détecteur évaporatif à diffusion de lumière
DHA : Acide docosahexaénoïque
DLS : Diffusion dynamique de la lumière (Dynamic Light Scattering)
DMPC : 1,2 dimyristoyl-sn-glycérol-3-phosphatidylcholine
DO : Densité optique
EDTA : Ethylène diamine tétra-acétique
EFS : Extraction par fluide supercritique
EMAG : Ester méthylique d'acide gras
EPA : Acide éicosapentaénoïque
ESI : Ionisation chimique par électrospray
EST : Ester de stérols
EtOH : Ethanol
GAE : Equivalent en acide gallique
GRAS : Generally considered as safe
GUV : Vésicule unilamellaire géante (Giant Unilamellar Vesicle)

(HP)LC : Chromatographie liquide (à haute performance)
LC-IP : Chromatographie liquide en phase inverse
LC-NP : Chromatographie liquide en phase normale
Hx : Hexane
IPA : Isopropanol
KCl : Chlorure de potassium
LA : Acide linoléique
LN : Lipides neutres
LPC : Lysophosphatidylcholine
LPE : Lysophosphatidyléthanolamine
LPA : Acide lysophosphatidique
LT : Lipides totaux
LUV : Vésicule unilamellaire large (Large Unilamellar Vesicle)
m : Masse
M₀ : Moment magnétique
MAG : Monoacylglycérol (ou monoglycéride)
MeOH : Méthanol
MLV : Vésicule multilamellaire (Multilamellar Vesicle)
MRM : Multiple Reaction Monitoring
MS : Spectrométrie de masse
MVV : Vésicule multivésiculaire (Multivesicular Vesicle)
OGM : Organismes génétiquement modifiés
OLV : Vésicule oligolamellaire (Oligolamellar Vesicle)
PA : Acide phosphatidique
PC : Phosphatidylcholine
PE : Phosphatidyléthanolamine
PG : Phosphatidylglycérol
PI : Phosphatidylinositol
PL : Phospholipides
PLFA : Acide gras des phospholipides
PS : Phosphatidylsérine
RMN : Résonance magnétique nucléaire
SDG : Diglucoside secoisolariciresinol
SM : sphingomyéline

SUV : Vésicule unilamellaire de petite taille (Small Unilamellar Vesicle)

TAG : Triacylglycérol (ou triglycéride)

TEA : Triéthylamine

THC : δ -9- tétrahydrocannabinol

TPP : Triphénylphosphate

Δm : masse charge – masse résidu

η : Rendement

ζ : Potentiel zêta

Introduction générale

Les liposomes, vésicules à base de phospholipides (PL), sont des systèmes colloïdaux utilisés, d'une part, en recherche comme structures membranaires modèles ou comme systèmes vecteurs et, d'autre part, dans différents domaines industriels, comme la pharmacie, la cosmétique, et plus récemment la nutrition (Akbarzadeh et al., 2013; Lorin et al., 2004). De nombreux articles et brevets ont été publiés ces dernières années, avec plus de 3 000 brevets dans le domaine de la vectorisation de principes actifs (Gómez-Hens and Fernández-Romero, 2006). Cependant, seuls quelques produits pharmaceutiques commerciaux à base de liposomes sont actuellement disponibles sur le marché (en 2008, 11 principes actifs vectorisés par des liposomes ont été approuvés), bien que de tels systèmes soient actuellement en développement préclinique et clinique avec des résultats prometteurs. Les deux raisons principales au développement industriel limité des liposomes sont le manque de données sur le comportement chimique et physique de ces structures en regard des domaines d'applications spécifiques et le manque de diversité des sources de phospholipides.

Jusqu'à présent, les phospholipides naturels utilisés pour fabriquer les liposomes sont extraits essentiellement du soja en tant que source végétale et du jaune d'œuf en tant que source animale. Les phospholipides d'origine végétale (1% dans l'huile brute de colza, 3,5% de l'huile de soja) sont extraits à partir d'une pâte de dégomme, co-produit du procédé de raffinage des huiles. En 2012, la production d'huile en France était de $4,5 \cdot 10^6$ tonnes (données Proléa), ce qui laisse présager un potentiel de production de lécithines important. L'industrie de la pêche génère aussi des co- et/ou sous-produits pouvant représenter une source potentielle de phospholipides (Henna Lu et al., 2011). Ce marché, bien qu'encore peu développé, intéresse plusieurs compagnies qui commencent à les introduire sur le marché (Henna Lu et al., 2011). Outre l'intérêt d'élargir le spectre des PL pour la fabrication des liposomes, la diversification des sources permettrait de disposer de compositions en acides gras (AG) variées. En effet, si les PL issus du soja sont riches en acides gras polyinsaturés (AGPI) de la série n-6 (ou $\omega 6$), les PL extraits des sources marines sont caractérisés par des AGPI à très longue chaîne de la série n-3 (ou $\omega 3$). On pressent l'intérêt nutritionnel de tels PL quand on connaît, d'une part, les effets positifs des AGPI n-3 dans la prévention d'un certain nombre de pathologies, notamment les maladies cardiovasculaires, et, d'autre part, l'insuffisance des apports nutritionnels en AGPI n-3. Parallèlement, on peut remarquer que les méthodes industrielles d'extraction des phospholipides sont basées essentiellement sur l'utilisation de solvants organiques. La politique actuelle de développement durable entraîne l'émergence de technologies GRAS (Generally considered as safe) qui répondent aux attentes sanitaire, environnementale et sociétale, accompagnées d'une réduction des coûts énergétiques. L'utilisation des fluides supercritiques, principalement le dioxyde de carbone supercritique ($\text{CO}_2\text{-SC}$), dans le cas de l'extraction des lipides répond à ces nouvelles exigences.

C'est dans ce contexte de diversification des sources de phospholipides et d'utilisation de méthodes d'extraction respectueuses de l'environnement que se situe ce travail de thèse. Il se propose d'étudier l'extraction de PL, par le CO_2 supercritique, à partir de différentes sources végétales et d'une source animale avec comme objectif final la formulation de ces PL dans des liposomes. Dans un premier temps, la partie introductive présente les sources actuelles de PL et les méthodes

conventionnelles utilisées pour les extraire. L'approche utilisant le CO₂ supercritique pour extraire les lipides est ensuite présentée en insistant plus particulièrement sur les paramètres à optimiser pour extraire plus spécifiquement les PL. Enfin, l'utilisation des PL pour former des liposomes est décrite. Dans un deuxième temps, les méthodes utilisées dans ce travail de thèse sont détaillées au sein de la partie Matériel et méthodes. La troisième partie, Résultats et discussion, s'articule autour de trois chapitres. Après une étude préalable des sources naturelles potentielles de PL, le premier chapitre présente la démarche méthodologique mise en place pour discriminer et quantifier différents types de lipides, d'abord sur des systèmes modèles puis sur des extraits de lipides totaux. Le deuxième chapitre s'attache à caractériser les fractions supercritiques obtenues dans différentes conditions d'extraction. Cette étude permet d'appréhender l'influence de paramètres opératoires sur la pureté des fractions obtenues. Le troisième chapitre est une première approche de formulation de liposomes/éthosomes en faisant varier les conditions de préparation ou la nature des PL.

Ce travail de thèse s'inscrit dans le projet Omegasomes financé par l'agence nationale de la recherche (ANR). Il s'agit d'un projet de recherche à but finalisé qui s'appuie sur du développement expérimental (procédé et analytique). Outre le laboratoire de Chimie et Biologie des Membranes et Nanoobjets (CBMN, Université de Bordeaux, Bordeaux INP, CNRS), il associe l'Unité Universitaire Interdisciplinaire Lip(Sys)² Lipides : Systèmes analytiques et biologiques (Université Paris-Saclay), le Service d'Analyse des Médicaments et Métabolites (SAMM, IPSIT, Université Paris-Saclay), le laboratoire des Sciences Analytiques Bioanalytiques et Miniaturisation (ESPCI, ParisTech) et l'Institut de Mécanique et d'Ingénierie (I2M, Université de Bordeaux, UMR CNRS 5295, Bordeaux INP, ENSAM).

Chapitre 1 : *Données bibliographiques*

I. Lécithines, phospholipides et leurs modes d'extraction

Pour l'industrie agroalimentaire, une lécithine, correspond à un additif alimentaire (E322) composé d'un mélange de phospholipides (teneur supérieure à 50 ou 60% suivant les législations), de cholestérol et de triglycérides (TAG) (Li et al., 2015 ; Rossi, 2007 ; van Nieuwenhuyzen and Tomás, 2008). En 2008, la production de lécithines se situait entre 150.10^3 et 170.10^3 tonnes. Si l'on se base sur un prix de vente moyen de 9,25 euros.kg⁻¹, on peut estimer que le chiffre d'affaire du marché des lécithines se situe entre 1,4 et 1,6 milliard d'euros. A l'heure actuelle, la source principale de lécithines est le soja. Cependant, à cause de la législation concernant la vente de produits issus d'organismes génétiquement modifiés (OGM) et du fait que le soja produit est principalement d'origine OGM (Van Nieuwenhuyzen, 2014), de nouvelles sources de lécithines végétales sont apparues, issues du tournesol et du colza. Parallèlement, des lécithines d'origine animale issues du jaune d'œuf et de divers organismes marins (krill, œufs de poisson) sont aussi produites et commercialisées. Dans la suite de cette introduction bibliographique, le terme de lécithine sera assimilé à un mélange naturel de phospholipides.

I.1 PHOSPHOLIPIDES

Les phospholipides sont constitués d'une molécule de glycérol sur laquelle sont estérifiés deux acides gras en positions sn-1 et sn-2, constituant la partie apolaire de la molécule. La position sn-3 comporte un groupement phosphoryle sur lequel peut venir se greffer un groupement azoté (choline, sérine ou éthanolamine), un sucre (inositol) ou un autre glycérol (Figure 1.1). Cette partie de la molécule constitue la partie polaire du phospholipide. Du fait de la présence d'une partie polaire et d'une partie apolaire au sein d'une même molécule, un phospholipide est une molécule amphiphile.

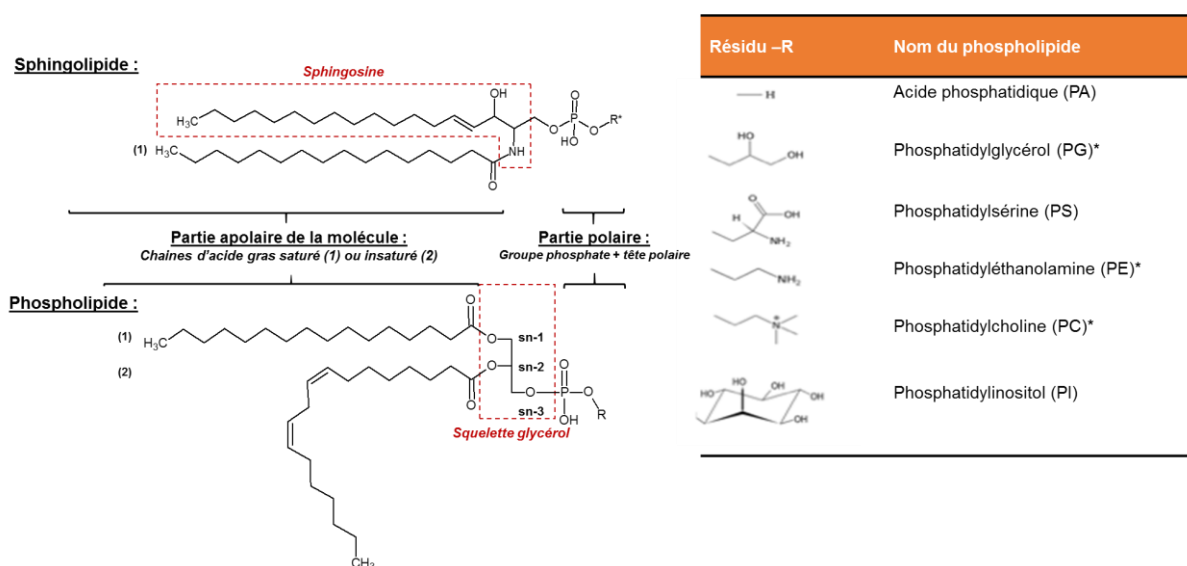


Figure 1.1 : Structure chimique des principaux lipides phosphorés.

*Seules têtes polaires possibles pour les sphingolipides (Leray, 2010)

En fonction de leur origine, les lécithines sont différenciées par la proportion des différentes classes de phospholipides. La phosphatidylcholine (PC) est le phospholipide le plus abondant dans les membranes des cellules eucaryotes, ce qui explique sa forte proportion dans la plupart des lécithines (Cole et al., 2012). La PC représente entre 29 et 41% des phospholipides totaux des sources végétales et entre 26 et 76% des phospholipides dans les matrices animales (Tableau 1.1.A et 1.1.B). La phosphatidyléthanolamine (PE) est une classe présente entre 15 et 30% selon les sources. Le phosphatidylinositol (PI) est surtout présent dans les sources végétales, et représente entre 13 et 23% des phospholipides totaux. La phosphatidylsérine (PS) et l'acide phosphatidique (PA), quant à eux, sont généralement peu présents (moins de 10%). Dans les sources animales, on note la présence de sphingolipides, lipides phosphorés basés sur un squelette sphingosine au lieu du glycérol, représentés essentiellement par la sphingomyéline (SM) avec une tête polaire choline (Avalli and Contarini, 2005 ; Küllenberg et al., 2012) (Figure 1.1).

Les différentes lécithines se distinguent aussi par leur composition en acides gras. Les sources végétales terrestres sont caractérisées par des chaînes d'acides gras contenant, généralement, au plus 18 atomes de carbone. Les lécithines de soja et de tournesol sont riches en acides gras polyinsaturés n-6. La lécithine de colza contient principalement de l'acide oléique (18:1 n-9) et de l'acide linoléique (LA, 18:2 n-6). Cependant, ces trois sources végétales se caractérisent par une faible présence d'AGPI n-3 (inférieure à 10%) représentés par l'acide α -linolénique (ALA, 18:3 n-3) chez les espèces végétales. Pour les sources animales, les acides gras présents peuvent être à plus longues chaînes, notamment pour les phospholipides extraits d'organismes marins qui se caractérisent par une présence importante d'AGPI n-3 : acide éicosapentaénoïque (EPA, 20:5 n-3) et acide docosahexaénoïque (DHA, 22:6 n-3) (Ishii et al., 1988 ; Pinsolle et al., 2014).

Tableau 1.1 : Composition en phospholipides et en acides gras de différentes lécithines végétales (A) et animales (B).

A : Phospholipides et acides gras de lécithines végétales.

| Phospholipides | Soja (Liu and Ma, 2011) | Tournesol (Hollo et al., 1993) | Colza (van Nieuwenhuyzen and Tomás, 2008) |
|---|----------------------------|-----------------------------------|---|
| Composition en phospholipides (%) | | | |
| Phosphatidylcholine | 29 – 39 | 41 | 37 |
| Phosphatidyléthanolamine | 20 – 26 | 17 | 20 |
| Phosphatidylinositol | 13 – 18 | 23 | 22 |
| Phosphatidylsérine | 6 | - | - |
| Acide phosphatidique | 5 – 9 | 3 | 9 |
| Sphingomyéline | - | - | - |
| Autres phospholipides | 9 | 16 | 13 |
| Composition en acides gras des phospholipides totaux (%) | | | |
| 16:0 | 12 - 43 | 17 | 7 |
| 18:0 | 4 – 12 | 5 | 1 |
| 18:1 (n-9) | 7 – 39 | 9 | 56 |
| 18:2 (n-6) | 17 – 61 | 67 | 25 |
| 18:3 (n-3) | 2 - 9 | - | 6 |
| 20:4 (n-6) | - | - | - |
| 20:5 (n-3) | - | - | - |
| 22:6 (n-3) | - | - | - |
| Autres | 9 – 13 | 2 | 5 |

B : Composition en phospholipides et en acides gras de lécithines animales.

| Phospholipides | Jaune d'œuf (<i>Gladkowski et al., 2011 ; Rossi, 2007</i>) | Lécithine marine (<i>Pinsolle et al., 2014</i>) | Lait (<i>Schneider, 2011</i>) |
|--|--|---|---|
| Composition en phospholipides (%) | | | |
| Phosphatidylcholine | 66 – 76 | 64 | 26 |
| Phosphatidyléthanolamine | 15 – 24 | 30 | 23 |
| Phosphatidylinositol | - | 1 | 7 |
| Phosphatidylsérine | 1 | 3 | 8 |
| Acide phosphatidique | - | 0 | 2 |
| Sphingomyéline | 3 – 6 | - | 26 |
| Autres phospholipides | 3 – 6 | 1 | - |
| Composition en acides gras des phospholipides totaux (%) | | | |
| 16:0 | 29 | 29 | 23 |
| 18:0 | 14 | 3 | 15 |
| 18:1 (n-9) | 31 | 3 | 36 |
| 18:2 (n-6) | 16 | 0 | 9 |
| 18:3 (n-3) | - | 0 | 1 |
| 20:4 (n-6) | 5 | 2 | - |
| 20:5 (n-3) | - | 15 | - |
| 22:6 (n-3) | 3 | 40 | - |
| Autres | 2 | 9 | - |

I.2 DOMAINES D'APPLICATION DES LECITHINES

Les lécithines, de par leur teneur en phospholipides, sont utilisées dans de nombreux secteurs industriels tels que l'agroalimentaire (produits de boulangerie, margarines, chocolat), la cosmétique ou la pharmacie. En agroalimentaire, les phospholipides sont utilisés pour leurs propriétés technologiques. En effet, grâce à leur caractère amphiphile, ces molécules ont des propriétés émulsifiantes (Szuhaj, 1983 ; van Nieuwenhuyzen and Tomás, 2008) en se positionnant à l'interface huile/eau d'une émulsion et en stabilisant ainsi les globules de gras. Les phospholipides sont aussi utilisés comme agent épaississant, dans la préparation de crèmes par exemple (Miura et al., 2006) ou pour leurs propriétés antioxydantes (Cabezas et al., 2013 ; Koprivnjak et al., 2008 ; Pichot et al., 2013). En pharmacie et cosmétique, les phospholipides sont utilisés, soit pour leurs propriétés émulsifiantes, soit pour leurs propriétés d'auto-assemblage leur permettant d'encapsuler des molécules thérapeutiques (Cansell, 2007). Cette dernière propriété sera développée plus en détail dans le § III.1. En cosmétique, les phospholipides sont aussi utilisés pour leur effet mouillant qui

permet la dispersion de pigments au sein de la phase huileuse (Lefur and Arnaud, 2004 ; Lefur et al., 2008).

Les phospholipides jouent aussi un rôle important au niveau nutritionnel, soit comme vecteurs de choline (via la PC) ou de sérine (via la PS), soit comme vecteurs d'acides gras indispensables ou essentiels (Cansell, 2010, Küllenberg et al., 2012). Par exemple, dans la PC, la choline limite les dépôts adipeux hépatiques et améliore le métabolisme des triglycérides en s'incorporant dans des lipoprotéines responsables du transport des triglycérides hépatiques vers le foie. Ainsi, chez des patients traités avec de la lécithine de soja (3,5 g de lécithine, 3 fois par jour), les taux de cholestérol et de triglycérides sanguins diminuent après 30 jours de traitement (Wojcicki et al., 1995). Les phospholipides participent donc à la prévention des risques cardiovasculaires. La PS cérébrale semble jouer un rôle important dans les phénomènes de neuro-protection en modulant l'apoptose cellulaire (même si le mécanisme exact reste encore à élucider) et en régulant un certain nombre d'activités enzymatiques. Plusieurs études d'intervention évaluent l'effet de l'ingestion de PS sur les fonctions cognitives, que ce soit dans la survenue de la démence ou sur l'évolution (et possiblement la réduction) des symptômes cognitifs chez des patients diagnostiqués comme déments (Moré et al., 2014 ; Vakhapova et al., 2011). Parallèlement, les phospholipides sont des vecteurs d'acides gras au même titre que les triglycérides. On peut donc leur attribuer les fonctions physiologiques associées, notamment des fonctions dans la prévention d'un certain nombre de pathologies : inflammatoire (fibrose cystique, l'arthrite rhumatoïde), cardio-vasculaire, voire neuro-dégénérative et psychiatrique (Lauritzen et al., 2001 ; Peet and Stokes, 2005 ; Ruxton et al., 2007). Enfin, l'intérêt des phospholipides par rapport aux triglycérides est une amélioration de la bio-accessibilité des acides gras comme l'attestent des études menées sur modèle animal (Cansell, 2010) et chez des enfants prématurés (Carnielli et al., 1998).

I.3 EXTRACTION INDUSTRIELLE DES LECITHINES

I.3.1 Extraction des lécithines végétales

La lécithine végétale est un sous-produit de l'industrie des huileries. Les huiles brutes obtenues par pressage ou extraites par solvant organique (généralement l'hexane) peuvent être raffinées pour éliminer un certain nombre de composants considérés comme délétères vis-à-vis de la qualité de l'huile, dont font partie les phospholipides. En effet, la présence de phospholipides dans les huiles brutes entraîne une acidification de l'huile, une oxydation des acides gras due à l'affinité des têtes polaires pour les métaux lourds, une diminution du rendement du procédé due aux propriétés tensioactives, une désactivation des terres décolorantes utilisées en fin de raffinage et un colmatage rapide des filtres (Karleskind, 1992 ; Pages, 2008). Ainsi, les phospholipides sont éliminés au début du raffinage lors de l'étape de démulcination ou dégomme.

Le dégomme consiste à disperser dans l'huile brute chauffée à 60°C, 1 à 3‰ d'acide phosphorique commercial à 75%. La présence de l'acide va rendre hydratables certains phospholipides peu polaires (notamment l'acide phosphatidique) par la formation de sels

monovalents. Après une phase de mélange de quelques dizaines de minutes, l'émulsion est chauffée à 90°C et hydratée avec 2 à 3% d'eau avant d'être brassée à nouveau pendant une vingtaine de minutes pour permettre l'hydratation de l'ensemble des phospholipides. Le mélange est ensuite refroidi jusqu'à 50°C pour insolubiliser les phosphatides avant leur séparation par centrifugation (Karleskind, 1992). La « gomme » obtenue est séchée par évaporation via un évaporateur à couche mince. Cet appareil, utilisé dans l'industrie alimentaire ou chimique, permet une séparation entre les produits d'intérêt et le solvant à partir de solutions de viscosité variable (max 500 Pa.s). La lécithine est, par la suite, conservée au froid (van Nieuwenhuyzen and Tomás, 2008).

La lécithine brute peut encore contenir jusqu'à 33% d'huile. Ainsi, suivant le degré de pureté souhaité, une étape de déshuilage peut être réalisée par de l'acétone à froid (0°C à 4°C) qui solubilise les triglycérides et précipite les phospholipides (Hruschka et al., 2009). Pour augmenter davantage la pureté de la lécithine en phospholipides, il est possible de réaliser plusieurs étapes de lavage mais cela conduit à utiliser des quantités importantes de solvant (la quantité d'acétone utilisée à chaque lavage est 5 fois supérieure à la quantité de phospholipides présents) (Ceci et al., 2008 ; Liu and Ma, 2011). Les lécithines industrielles trouvées sur le marché peuvent ensuite subir diverses transformations en fonction des applications visées : purification (pour enrichir le mélange de phospholipides en une classe particulière) ou hydrolyse partielle (pour augmenter les propriétés fonctionnelles de la lécithine) (Guo et al., 2005 ; van Nieuwenhuyzen and Tomás, 2008) (Figure 1.2).

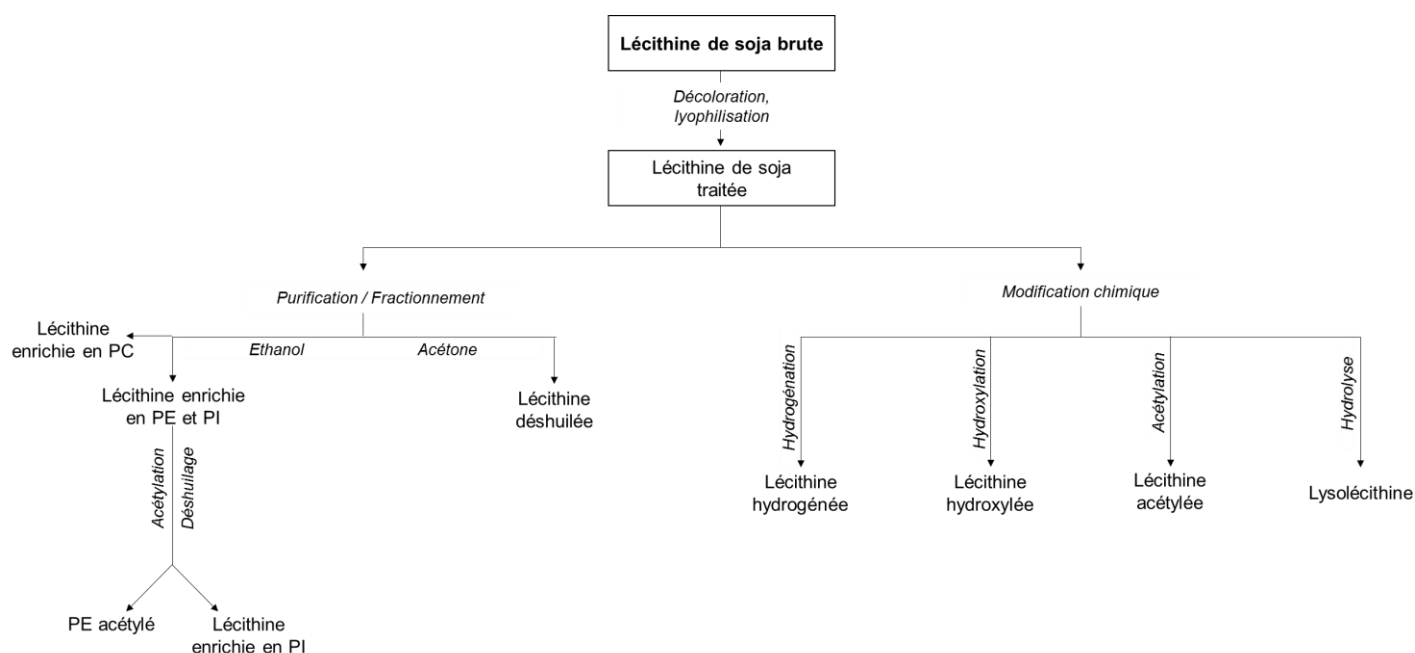


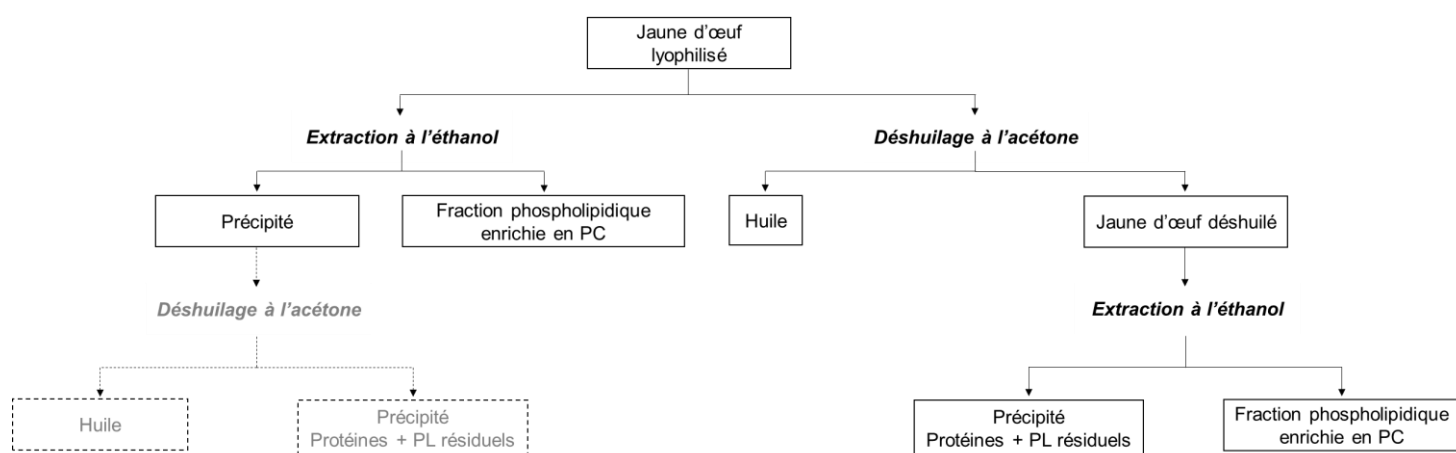
Figure 1.2 : Transformations possibles d'une lécithine brute (Guo et al., 2005).

PC : Phosphatidylcholine ; PE : Phosphatidyléthanolamine ; PI : Phosphatidylinositol

I.3.2 Extraction de la lécithine d'œuf

L'extraction industrielle de la lécithine d'œuf se fait à partir du jaune d'œuf lyophilisé. Deux protocoles peuvent être appliqués (Figure 1.3). Le premier consiste à déshuiler le jaune d'œuf par

l'utilisation d'acétone à froid (comme pour déshuiler la lécithine végétale), puis à extraire les phospholipides à l'aide d'éthanol. Deux produits sont obtenus : une fraction phospholipidique contenant majoritairement de la phosphatidylcholine, et un précipité protéique (Palacios and Wang, 2005). Le second protocole consiste à réaliser l'extraction des phospholipides par l'éthanol en premier lieu. Cela permet d'obtenir une fraction enrichie en PC en une seule étape (Hruschka et al., 2009 ; Palacios and Wang, 2005). Le choix d'un protocole ou d'un autre dépend de la pureté recherchée en PC (Tableau 1.2). Les deux méthodes extraient de façon préférentielle la phosphatidylcholine. La récupération des autres phospholipides nécessite des étapes d'extraction supplémentaires à partir



des précipités obtenus.

Figure 1.3 : Protocoles possibles pour l'extraction industrielle de la lécithine d'œuf (Palacios and Wang, 2005).

PL : Phospholipides ; PC : Phosphatidylcholine.

Tableau 1.2 : Valeurs moyennes des rendements, de la pureté et du taux de récupération de la phosphatidylcholine (PC) (d'après Palacios and Wang, 2005).

| | Déshuilage à l'acétone avant extraction à l'éthanol | | | Extraction à l'éthanol sans déshuilage | | |
|--------------------------------|---|----------------------------|--|--|----------------------------|--|
| | Rendement ^a (%) | Pureté ^b (%) | Taux de récupération ^c (%) | Rendement ^a (%) | Pureté ^b (%) | Taux de récupération ^c (%) |
| Fraction enrichie en PC | 13,5 | 53,3 | 50,6 | 23,9 | 35,7 | 60,0 |

^aRendement : Quantité de matière dans la fraction phospholipidique / quantité d'œuf initiale

^bPureté : Phospholipides présents dans la fraction / quantité de matière dans la fraction

^cTaux de récupération : Phospholipides présents dans la fraction / Phospholipides initialement présents dans le jaune d'œuf.

PC : phosphatidylcholine.

I.3.3 Extraction de la lécithine marine

La lécithine marine est obtenue suite au dégommeage de l'huile brute de poisson. Ce dégommeage se fait en présence d'eau acidifiée ou non. Une suite de lavages est effectuée afin de récupérer la majorité des phospholipides (Ifremer, 2010) (Figure 1.4). La lécithine brute obtenue peut ensuite subir des transformations comme indiqué dans la figure 1.2.

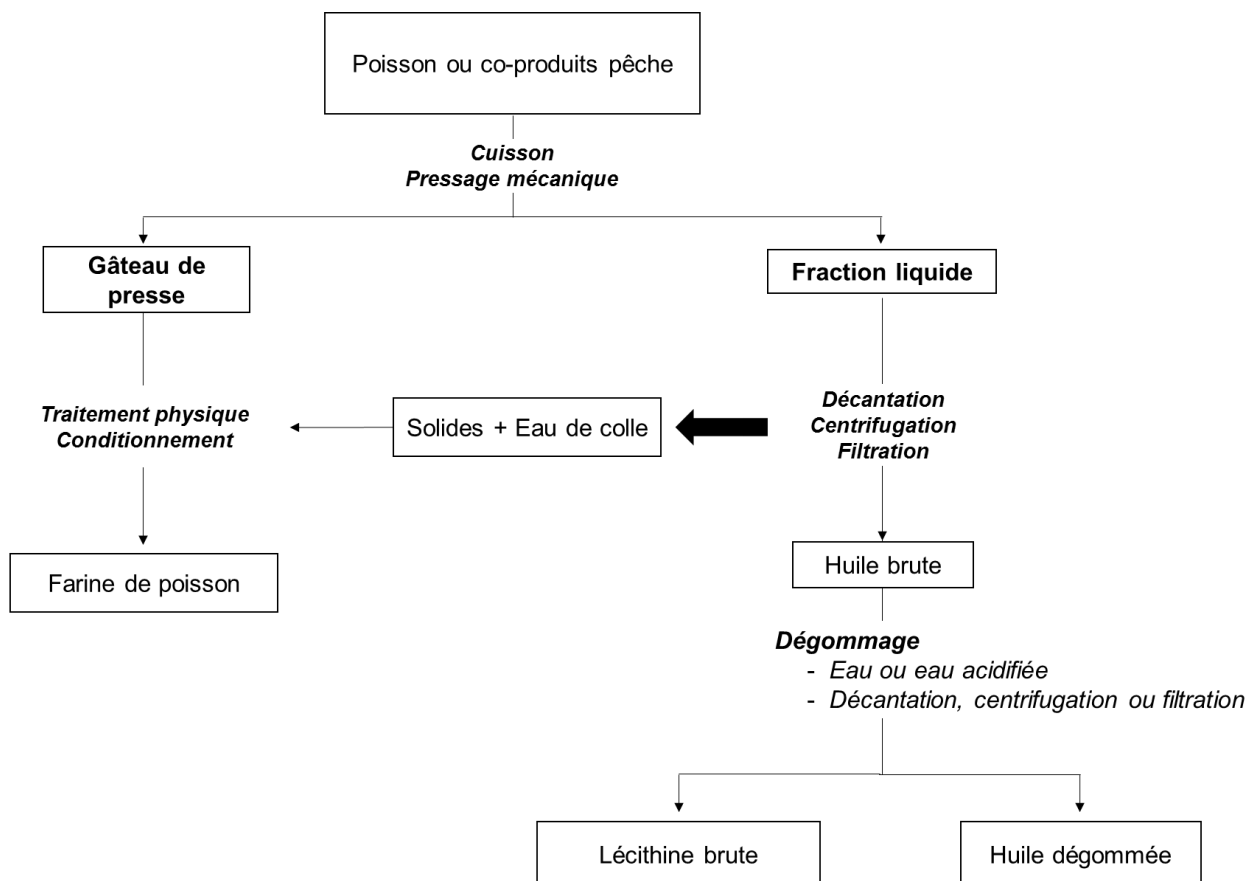


Figure 1.4 : Extraction industrielle de la lécithine marine (Ifremer, 2010).

En conclusion, même si les procédés industriels actuels pour produire des lécithines tendent à minimiser ou à recycler les solvants utilisés, ils présentent des inconvénients. Les solvants organiques utilisés (acétone et hexane) sont inflammables et peuvent présenter une toxicité pour le consommateur, si les quantités de solvant résiduelles sont trop élevées. Pour l'Union Européenne, la quantité d'acétone admise dans les denrées alimentaires ne doit pas excéder la dose « techniquement inévitable », dose non précisée. Pour l'hexane, l'Union Européenne admet un résidu maximal de solvant dans les huiles et les produits gras de 1 mg.kg^{-1} de matières extraites. Les procédés d'extraction comprennent aussi une succession d'étapes pouvant favoriser la dégradation des phospholipides par oxydation (si elles ne sont pas réalisées sous pression d'oxygène réduite) ou par hydrolyse (chauffage), d'autant plus que le procédé d'obtention est long (environ 6 heures à partir de l'étape de dégommeage). De plus, la majorité des procédés d'obtention des lécithines est constituée

d'une étape préliminaire de déshuilage pour pouvoir obtenir des phospholipides avec une pureté supérieure à 50% (Tableau 1.2). Dans ce contexte, il serait intéressant d'envisager des procédés d'extraction plus rapides, plus efficaces et plus respectueux de l'environnement.

II. EXTRACTION DES LIPIDES PAR FLUIDE SUPERCRITIQUE

L'utilisation des fluides supercritiques, connus depuis 1822 suite à la découverte du Baron Cagniard de la Tour, a pris son essor dans les années 1960. Les fluides supercritiques ont des applications multiples dans de nombreux domaines (Figure 1.5.A). Cependant jusqu'au début du XXI^{ème} siècle, l'utilisation prédominante de ces fluides était l'extraction comme l'atteste le nombre de brevets déposés depuis les années 1980 (Figure 1.5.A) (Schütz, 2007).

Si l'on s'intéresse maintenant au nombre de publications ayant trait à l'extraction, on observe une stagnation entre 1996 et 2006 (Figure 1.5.B). Puis, on assiste à une recrudescence dans ce domaine. Le nombre de publications liées plus spécifiquement à l'extraction des huiles ne devient significatif qu'à partir de 1996 avec, par exemple en 2013, 186 publications sur ce sujet. Cependant, l'extraction de lipides polaires par fluide supercritique est encore un sujet peu exploité avec seulement 48 publications depuis 1984 (Figure 1.5.B) (Scopus : mot clé = supercritical fluid extraction ; supercritical fluid extraction oil ; supercritical fluid extraction polar lipids).

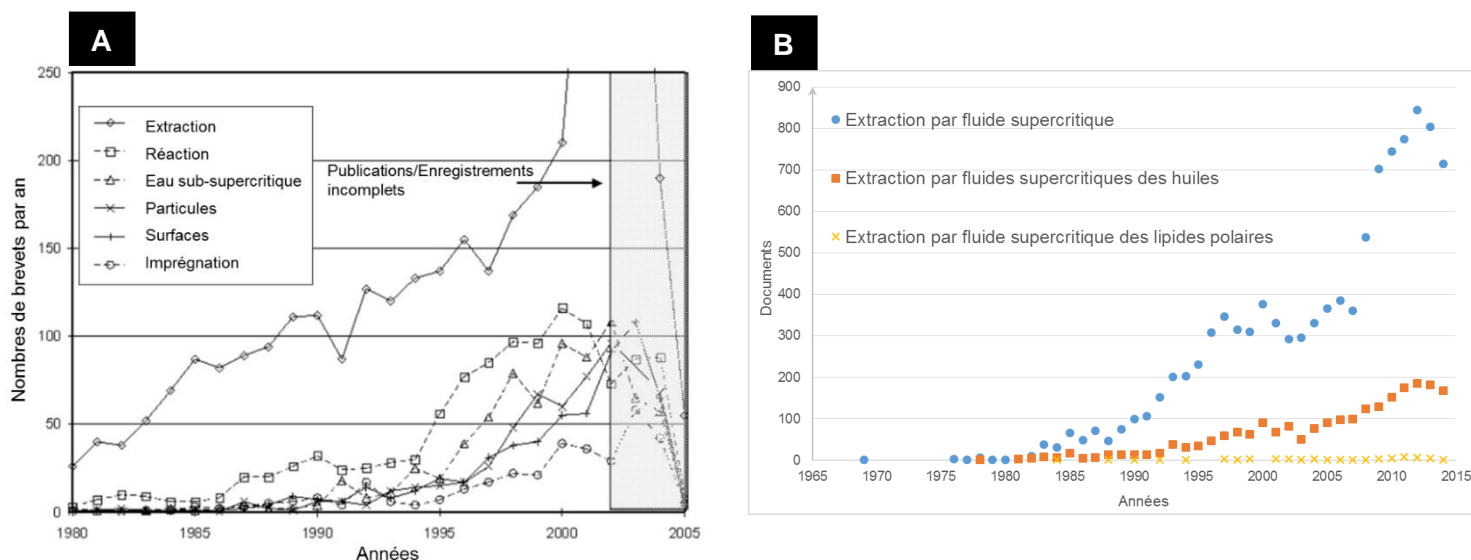


Figure 1.5 : Bibliographie relative à l'utilisation des fluides supercritiques. A : Nombre de brevets déposés sur les fluides supercritiques répertoriés par domaine d'activité ; B : Nombre de publications sur l'extraction par fluide supercritique (Schütz, 2007 et données extraites de Scopus).

II.1 DEFINITIONS ET PROPRIETES

Tout corps pur existe sous trois états : solide, liquide et gaz. Dans le diagramme pression-température, les domaines d'existence des états sont délimités par des courbes d'équilibre où deux phases coexistent. Cependant, au-delà d'un couple pression-température particulier, dit point critique, la délimitation liquide-gaz n'existe plus. On parle alors de fluide supercritique (Figure 1.6). Un fluide porté dans ces conditions présente des propriétés très particulières sur lesquelles vont reposer un certain nombre de procédés développés aujourd'hui.

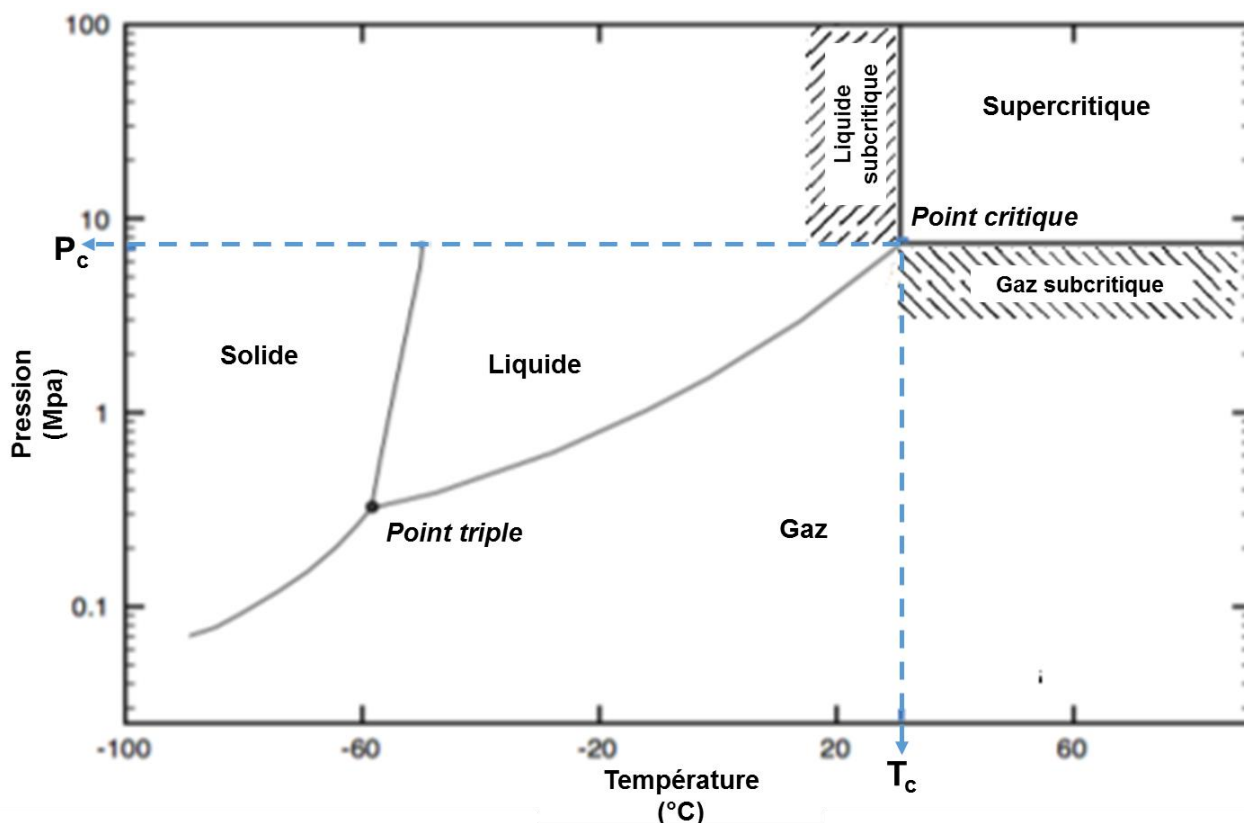


Figure 1.6 : Diagramme de phase d'un corps pur : exemple du dioxyde de carbone (CO₂) (Figure adaptée de Brunner, 2005).

Les fluides supercritiques possèdent des propriétés physico-chimiques particulières. Leur densité élevée, proche de celle des liquides, contribue à la solubilisation de composés, tandis que leur faible viscosité, proche cette fois-ci de celle des gaz, ainsi que leur diffusivité sont propices à accélérer les transports de matières (Sahena et al., 2009) (Figure 1.7.A). De plus, ces trois propriétés physiques peuvent être modulées suivant la température et la pression appliquées au système, affectant ainsi l'efficacité de l'extraction. La densité est un paramètre important en extraction car souvent corrélée à la solubilité (Figure 1.7.B). Une solubilité variable avec la pression et la température peut être utile dans le cas d'extractions sélectives comme nous le verrons par la suite. Enfin, les dégradations telles que l'oxydation ou l'isomérisation sont minimisées au cours de ce procédé d'extraction puisque l'extraction se réalise en milieu anaérobie, à l'obscurité et à des températures modérées.

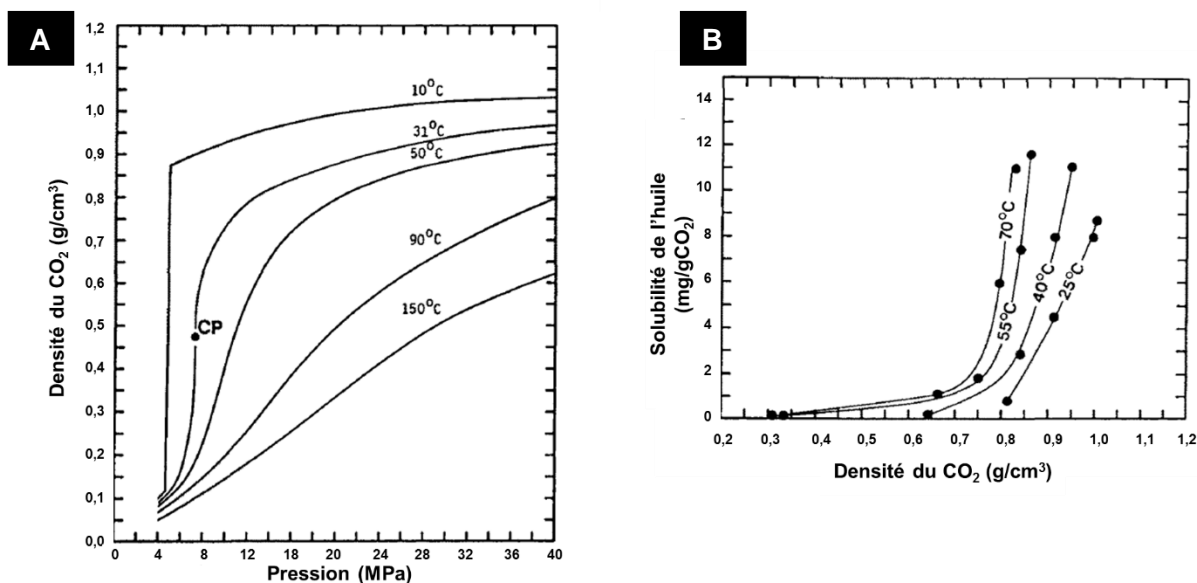


Figure 1.7 : Influence de la pression et de la température sur la densité du fluide (A) et sur la solubilisation d'une huile extraite de colza (B) (Fattori et al., 1988).

II.2 LE DIOXYDE DE CARBONE SUPERCRITIQUE (CO₂-SC)

Le CO₂ est utilisé dans de nombreuses d'applications industrielles (Brunner, 2005), notamment à cause de ses coordonnées critiques (31,1°C et 7,38 MPa) facilement accessibles. De plus, le CO₂ est disponible en grande quantité : principal rejet gazeux des industries, peu coûteux, non inflammable, non toxique (jusqu'à 7% dans l'air pour les premiers symptômes et plus de 30% pour la mortalité) et non corrosif. D'un point de vue industriel, l'utilisation du CO₂ est intéressante à plusieurs égards : aucune trace résiduelle dans le produit final car, aux conditions atmosphériques, le CO₂ est sous forme gaz, et il est reconnu comme substance GRAS. Enfin, de par les faibles valeurs critiques du CO₂, l'extraction peut être menée à des températures modérées et ainsi ne pas dégrader des molécules thermolabiles ou oxydables.

II.2.1 Extraction des lipides totaux par le dioxyde de carbone supercritique

Le CO₂ est une molécule apolaire, raison principale pour laquelle il est fréquemment utilisé pour l'extraction de molécules lipophiles. En 2014, une revue est publiée dans laquelle sont répertoriées les matrices à partir desquelles sont extraits des lipides sur les 3 dernières décennies (liste non exhaustive) (Martínez and Carolina de Aguiar, 2014). Les tableaux 1.3 présentent les matrices à partir desquelles une quantification (A) et une caractérisation des lipides extraits (B) ont été réalisées.

Tableau 1.3 : Extraction par fluide supercritique des lipides à partir de différentes sources végétales et animales. A : publications rapportant la quantité de lipides totaux. B : publications analysant la composition de la fraction lipidique (adapté de la revue de Martínez and Carolina de Aguiar, 2014).

A : Etudes portant sur la quantité de lipides totaux extraits par fluide supercritique.

| Matrice | Pression (MPa) | Température (°C) |
|---------------------------|-------------------|---------------------|
| SOURCES VEGETALES | | |
| Graines de raisin | 22,3-53,8 | 75-120 ^a |
| | 28-55 | 40 |
| | 30-40 | 35-40 |
| Noyau de pêche | 16-24 | 35-55 ^b |
| | 15,0-19,8 | 40-51 |
| Noix | 18,0-23,4 | 35-48 |
| Noisette | 15-60 | 40-60 |
| | 18-23 | 35-48 |
| Sacha Inchi | 30-40 | 40-60 |
| Palmiste | 20,7-48,3 | 40-80 |
| Peau de Banane | 10-30 | 40-50 |
| Graine de coton | 55 | 70-80 |
| Soja | 48 | 80 ^c |
| | 51,7-62,0 | 100 |
| Graine de tournesol | 35-52 | 40-80 |
| Graine de colza | 35-52 | 40-80 |
| Buriti | 20-30 | 40-55 |
| Algue rouge | 24,1-37,9 | 40-50 |
| Spiruline | 25-30 | 50-60 |
| Microalgue | 35 | 40 |
| SOURCES ANIMALES | | |
| Déchets de Sardine | 12,6-18,0 | 40-48 |
| Déchets de maquereau | 20-35 | 45-75 |
| | 34,5 | 35 |
| Co-produits de merlu | 18,0-57,7 | 40 |
| Sous-produit de crevettes | 15-35 | 40-50 |
| | 20-40 | 40-60 |
| Bœuf haché | 52 | 100 |
| Viande | 37 | 50 |

^a Rombaut et al., 2014

^b Ekinç and Gürü, 2014

^c Wilkinson et al., 2014

B : Etudes portant sur la composition de la fraction lipidique des extraits supercritiques.

| Matrices | Composés analysés |
|--------------------------|---|
| SOURCES VEGETALES | |
| Graines de raisin | Polyphénols ^a Acides gras des LT et TAG AG |
| Graines de potimarron | AG |
| Noyau de pêche | β -sitostérol ^b AG / Phénol AG / Tocophérols |
| Noix | AG / Tocophérol / Caroténoïde AG / Stérol / Tocophérol |
| Noisette | AG / Stérol / Tocophérol |
| Sacha inchi | AG / Tocophérol |
| Palmiste | AG |
| Graines de lin | AG |
| Tourteau de chanvre | Chlorophylle a et b / Carotène ^d |
| Buriti | Caroténoïdes / Tocophérol / AG |
| Algues rouges | AG |
| Spiruline | acide γ -linolénique (18:3, <i>n</i> -6) |
| Microalgue | AG |
| SOURCES ANIMALES | |
| Déchets de sardine | AG Stérols / TAG / AGL / Chol / Lipide polaire |
| Déchets de maquereau | AG |
| Co-produits de merlu | AG |
| Déchets de la crevette | AG |
| Viande | Différentes classes de lipides |
| Jaune d'œuf | Phospholipides Différentes classes de PL |

^d Aladic et al., 2014

LT : lipides totaux ; AGL : acides gras libres ; PL : phospholipides ; TAG : triglycérides ;
Chol : cholestérol

L'extraction par fluide supercritique peut être réalisée à partir de tout type de matrice, végétale ou animale, marine ou terrestre (Tableau 1.3). Les gammes de pression et de température sont du même ordre de grandeur pour les matrices végétales et les matrices animales, à savoir de 10 à 62 MPa et

de 30 à 100°C, avec un nombre important d'essais réalisés dans la gamme 20 à 38 MPa et 45 à 60°C (Tableau 1.3.A).

Le rendement global de l'extraction (masse totale extraite rapportée à la masse chargée) est influencé par différents paramètres opératoires. Une augmentation de la pression, à température constante, entraîne une augmentation du taux d'extraction (masse molécule *i* rapportée à sa masse dans la matrice) ou de la solubilité du soluté tel que l'huile (Figure 1.8). Cette tendance s'explique par une augmentation de la densité du fluide avec celle de la pression à température constante, qui se traduit sur l'accroissement du pouvoir solvant (Figure 1.7). Les effets de la température sur le rendement d'extraction ou la solubilité du soluté sont plus contradictoires. De nombreux résultats rapportent qu'en deçà d'une certaine pression, dite pression « cross over », la solubilité de la molécule d'intérêt augmente quand la température diminue. A contrario, au-dessus de cette pression, la solubilité augmente avec la température (Cheung, 1999 ; Tomita et al., 2014 ; Zhao and Zhang, 2014). Dans le cas des huiles, ce changement de comportement se fait aux alentours de 30 MPa (Figure 1.8). Ce phénomène s'explique de la manière suivante : l'augmentation de la température à pression constante entraîne une diminution de la densité du CO₂ (Figure 1.7), mais cela augmente, dans le même temps, la pression de vapeur des solutés. L'impact général de ces deux phénomènes en compétition dépend de la pression appliquée. En-dessous de la pression « cross over », l'effet de la densité prédomine et la solubilité diminue malgré une augmentation de la température. Au-dessus, la solubilité augmente avec la température à cause de l'effet sur la volatilité du soluté (Güçlü-Üstündağ and Temelli, 2000 ; Bulley et al., 1992).

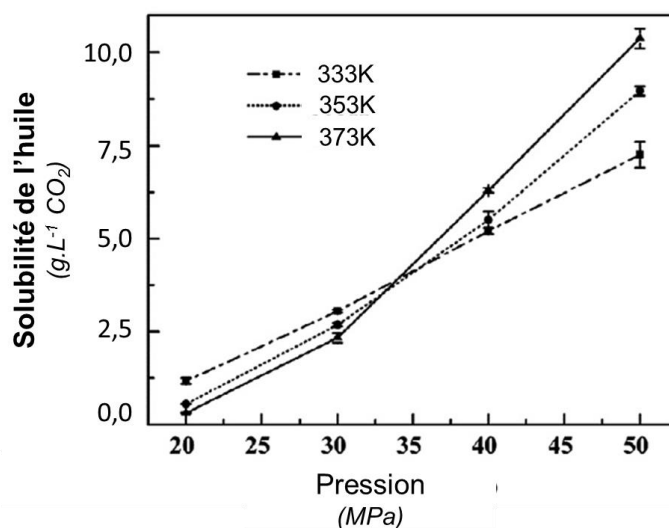


Figure 1.8 : Effet de la pression et de la température sur la solubilité de l'huile extraite de *Moringa oleifera* (Zhao and Zhang, 2014).

Les conditions opératoires n'affectent généralement pas la composition en acides gras des extraits obtenus par CO₂ supercritique à partir de fruits (Martínez et al., 2008 ; Mezzomo et al., 2010 ; Sánchez-Vicente et al., 2009). Toutefois, une étude réalisée sur une algue rouge indique que les extraits obtenus peuvent présenter différentes compositions en acides gras (Cheung, 1999). Une correspondance semble exister entre la longueur de la chaîne carbonée de l'acide gras présent dans

le triglycéride et la solubilité à pression constante. Un triglycéride homogène composé d'acide caproïque (8:0), la tricaproïne, a une solubilité supérieure à celle de la trilaurine (triglycéride homogène composé d'acide laurique (12:0)) pour une même pression. Cette différence s'estompe avec l'augmentation de la pression. A 35 MPa, la solubilité est la même pour des triglycérides homogènes de longueur de chaînes d'acides gras variées (Figure 1.9.A) (Hammam, 1992). Autrement dit, les triglycérides à chaînes courtes (< 8) sont solubilisés à partir d'une pression de 15 MPa, alors qu'il faudra appliquer une pression de 35 MPa pour solubiliser les triglycérides à chaînes plus longues. Ces comportements de solubilité sont confirmés lors de l'extraction d'huile de palme par CO₂ supercritique (Zaidul et al., 2007). Pour une pression inférieure à 30 MPa, les triglycérides portant des acides gras à courte chaîne sont extraits préférentiellement. Lors de l'augmentation de la pression, le pourcentage massique relatif aux triglycérides à chaîne moyenne (16 à 18) est augmenté (Figure 1.9.B).

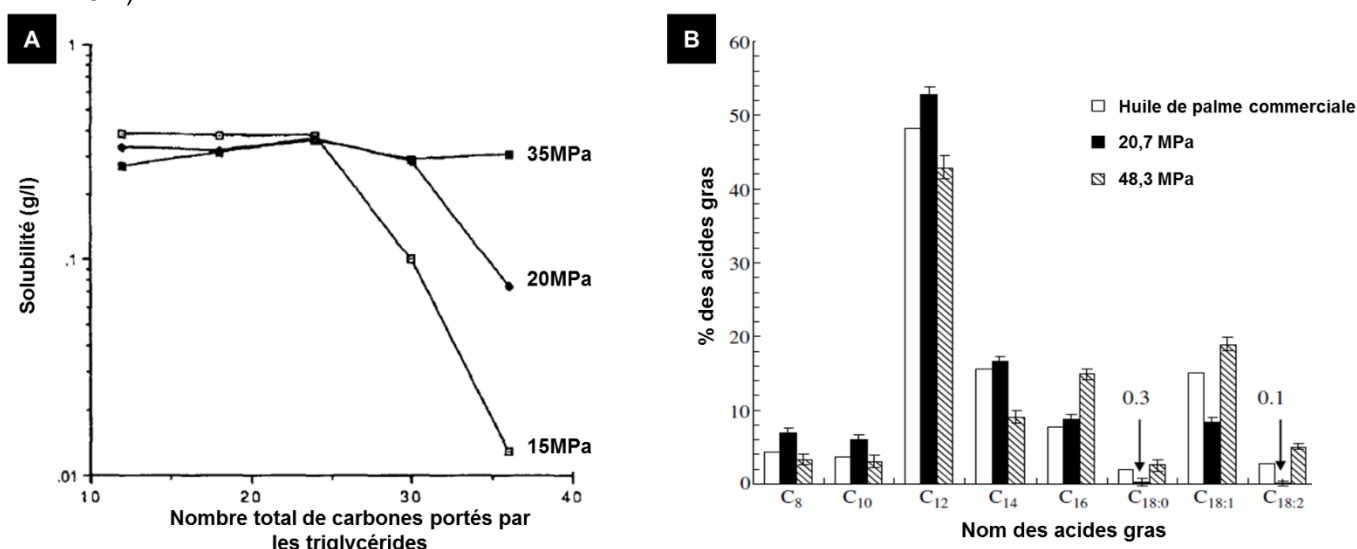


Figure 1.9 : Influence de la longueur de la chaîne d'acides gras lors de l'extraction par CO₂ supercritique. A : Expérience réalisée à partir de triglycérides homogènes à 40°C (Hammam, 1992) ; B : Composition en acides gras d'une huile de palme du commerce et d'une huile de palme extraite par CO₂ supercritiques obtenus à 80°C, à faible et haute pression (Zaidul et al., 2007).

Outre la solubilité, d'autres facteurs sont susceptibles d'affecter l'extraction des lipides tels que la taille des particules (Cao and Ito, 2003), le temps d'extraction (Mitra et al., 2009) et le débit du solvant utilisé (Sánchez-Vicente et al., 2009). L'ajout d'un co-solvant au CO₂ supercritique peut aussi favoriser l'extraction des lipides neutres (LN). En effet, l'ajout d'au maximum 5% en poids d'éthanol augmente la solubilité des lipides neutres dans le fluide sans co-extraction d'autres molécules lipophiles (Catchpole et al., 2009). La solubilité des molécules est aussi modulée par la pureté du soluté à extraire. Ainsi, la solubilité d'un composé peut être exacerbée dans un système à multi-composés à cause de la présence d'autres solutés, jouant l'effet d'un entraîneur (Boselli and Caboni, 2000 ; Güçlü-Üstündağ and Temelli, 2000).

II.2.2 Extraction des phospholipides par CO₂ supercritique avec ou sans co-solvant

Les phospholipides sont très peu solubles dans le CO₂ supercritique (Friedrich and Pryde, 1984 ; Shah et al., 2004), bien qu'ils possèdent une partie apolaire due à la présence des deux chaînes hydrocarbonées (Figure 1.1). Par exemple, la solubilité de la phosphatidyléthanolamine dans le CO₂ supercritique pur est de $3,8 \cdot 10^{-2}$ mg de PE.g⁻¹ de CO₂ à 15,2 MPa et 40°C, solubilité trop faible pour espérer utiliser ce procédé au niveau industriel (Acosta et al., 1994). A titre de comparaison, la solubilité de l'huile dans les mêmes conditions pression/température est de 1 mg d'huile.g⁻¹ de CO₂. En fait, les fonctions polaires tendent à diminuer la solubilité des PL dans le CO₂. Néanmoins, en 2000, l'extraction des phospholipides par CO₂ supercritique sans ajout de co-solvant à partir de jaune d'œuf lyophilisé a été réalisée par Boselli et Caboni avec des résultats similaires à ceux obtenus par solvants organiques (17,7 mg de PL pour 100 mg de jaune d'œuf (extraction supercritique) vs 18,3 mg PL pour 100 mg de jaune d'œuf (méthode Bligh and Dyer)) (Boselli and Caboni, 2000). Ce résultat est une exception dans l'étude de l'extraction des phospholipides par fluide supercritique et peut s'expliquer par une saturation du CO₂ par les lipides neutres, ce qui pourrait entraîner une co-élution des lipides polaires (Aro et al., 2009).

Le tableau 1.4 présente les conditions opératoires utilisées pour extraire les phospholipides à partir de diverses matrices. Dans ce tableau, sont également précisées les dimensions caractéristiques des dispositifs (volume du réacteur, masse traitée, débit de fluide, durée de l'extraction), afin de montrer la difficulté à rationaliser les résultats de la littérature tant les données sont disparates ou incomplètes. Néanmoins, quelques faits marquants peuvent être relevés. L'ensemble des données bibliographiques recensées dans le tableau 1.4 présente au moins deux extractions réalisées en présence de co-solvant.

L'ajout d'un co-solvant modifie les coordonnées pression-température du point supercritique qui varient en fonction de la nature et de la proportion du co-solvant dans le mélange. En termes de procédé, il est nécessaire d'imposer une pression et une température suffisamment élevées pour être au-delà du point critique du mélange. Le choix du co-solvant se fait suivant plusieurs critères. Il est dicté par les interactions possibles entre le co-solvant et la (les) molécule(s) d'intérêt à extraire. Ensuite, la toxicité, les précautions de manipulation (inflammabilité et réactivité avec l'air) et la facilité à le séparer du CO₂ à température ambiante doivent être prises en compte. Plusieurs solvants ont été testés pour l'extraction des phospholipides (Tableau 1.4) : méthanol, acétone, hexane, chloroforme, propanol/isopropanol et éthanol (Hanif et al., 2010). Au regard du critère de toxicité, l'éthanol, solvant GRAS, est le solvant généralement choisi. Sa teneur dans le fluide doit être aux alentours de 10%mass pour extraire les phospholipides (Dunford and Temelli, 1995 ; Montanari et al., 1996 ; Tanaka et al., 2004). Des essais de variation de la proportion d'éthanol au cours de l'extraction ont aussi été réalisés afin d'augmenter la pureté en phospholipides des extraits. Le protocole généralement appliqué dans ce cas nécessite un déshuilage préalable de la matière par CO₂ supercritique (Montanari et al., 1996 ; Shah et al., 2004 ; Tanaka et al., 2004). Cependant, la

comparaison des résultats entre les différents travaux de recherche n'est pas aisée du fait que le pourcentage en co-solvant peut s'exprimer de différentes manières (%mol, %mass et %vol).

Dans la littérature, les gammes de pression et de température appliquées sont de 15 à 68,9 MPa et de 27 à 80°C, respectivement. Dans 9 publications sur les 14 recensées, les extractions sont effectuées avec des pressions égales ou supérieures à 40 MPa. Ces pressions élevées ne semblent pas être indispensables dans le cas de l'extraction des phospholipides. En effet, pour une même proportion d'éthanol (entre 20 et 25% vol), le rendement d'extraction en phospholipides augmente d'un facteur dix lors d'une extraction à 17,7 MPa (Tanaka et al., 2004) par rapport à une extraction réalisée à une pression supérieure à 60 MPa (Montanari et al., 1996). Néanmoins, on ne peut pas exclure un effet de la nature de la matrice pour expliquer cette différence.

Enfin, une comparaison des résultats est difficile dû à l'expression des résultats. Dunford et Temelli (1995) expriment leurs résultats en termes de pureté de phospholipides, tandis que d'autres auteurs présentent leurs résultats en termes de solubilité de lipides totaux (Cocero and Calvo, 1996 ; Bulley et al., 1992 ; Subra et al., 2015 ; Temelli, 1992) ou de rendement (Tanaka et al., 2004). De plus, certains auteurs se sont intéressés soit à l'extraction globale des phospholipides, soit à l'extraction des différentes classes de phospholipides, ce qui fait que les résultats ne sont pas toujours exprimés sur une même base.

Tableau 1.4 : Présentation des différentes matrices, conditions opératoires appliquées et résultats de l'extraction des phospholipides par fluide supercritique avec l'utilisation d'un co-solvant.

| Echantillon | m _{chargée} (g) | T / P (°C / MPa) | Débit (L.min ⁻¹) | Temps (min) | Réacteur (mL) | Co-solvant | Résultats |
|--|-----------------------------|--|---------------------------------|---|------------------|---|--|
| Colza (Temelli, 1992) | | | | | | (%mass EtOH) | (mg de LT.g ⁻¹ CO ₂) |
| - Graine (45% huile) | 50 | 70 / 62 | 6,5.10 ⁻¹ * | 300 | 300 | - | 43,3 |
| - Tourteau (16% huile) | 50 | 70 / 62 | 6,5.10 ⁻¹ | 300 | 300 | - | 36 |
| - Farine (3% huile) | 50 | 40-70 / 20,8-62 70 / 62 | 6,5.10 ⁻¹ | 300 | 300 | 10 5 | 1 à 5 5,2 |
| Jaune d'œuf lyophilisé (Bulley et al., 1992) | 40 à 45 | 40 / 36 | 7,5 g.min ⁻¹ | Non Indiqué | 300 | (%mass) 3 (MeOH) 3 (EtOH) 5 (MeOH) | (mg de LT.g ⁻¹ CO ₂) 19,7 22,1 44,4 |
| Graine de coton (Kuk and Hron Sr, 1994) | 5 | 80 / 48,3 | Non Indiqué | 60 | 10 | (%vol) 5 (EtOH) 5 (IPA) | 33% d'huile extraite dont 570 ppm de P 32% d'huile extraite dont 573 ppm de P |
| Colza (Dunford et Temelli, 1995) | | | | | | (%mol EtOH) | (g de PL. 100 g ⁻¹ d'extrait) |
| - Graine (43% huile) | 45 | 45-70 / 55,2-62,1 70 / 55,2 | 3,0* 1,1 | 180 | 300 | - 8 | Aucun PL détecté <200ppm de PL dans l'huile |
| - Graine déshuilée par CO ₂ SC (env. 13% d'huile) | 45 | 70 / 55,2 70 / 55,2 45 / 55,2 45 / 41,1 | 3,0* | 180 | | 5 10 9,5 9 | 0,5 5,4 4,0 4,4 |
| - Graine déshuilée par CO ₂ SC (23% huile) | 45 | 55 / 41,1 55 / 55,2 | | 180 | | 9 10 | 5,1 0,7 |
| - Farine (8% huile) | 65 | 70 / 55,2 70 / 55,2 70 / 55,2 | 3,7* 3,7 3,7 | Non Indiqué Statique : 90 Extraction : 90 | | 5 9 55 mL d'EtOH 7,5 | 0,4 1,2 ~39 |

| Echantillon | m ^{chargée} (g) | T / P (°C / MPa) | Débit (L.min ⁻¹) | Temps (min) | Réacteur (mL) | Co-solvant | Résultats | | |
|--|-----------------------------|----------------------|---|----------------|------------------|------------------------|---|--------------------|-----|
| Graine de tournesol séchée (31% huile) (Cocero and Calvo, 1996) | 55 | 42 / 30 | Non indiqué | Non indiqué | 100 | (%mass EtOH) 5 à 20 | mg d'huile.g ⁻¹ de CO ₂ = 5 x %EtOH+b µg de P.g ⁻¹ d'huile = 12 x %EtOH+c | | |
| | | 42 / 15,0-35,0 | Non indiqué | Non indiqué | | | | | |
| | | 60 / 15,0-35,0 | | | | | | | |
| | | 80 / 15,0-35,0 | | | | | | | |
| Graines de soja déshuilées par CO₂ SC (Montanari et al., 1996) | 60 | 80 / 62,8 (ou 68,2?) | CO ₂ : 1,6-4,0 * EtOH : 0,4.10 ⁻³ -2,7.10 ⁻³ | Non indiqué | - | (%mol EtOH) | (% PL extraits) | | |
| | | | | | | 5 | 0,6 | | |
| | | | | | | 11 | 5,9 | | |
| | | | | | | 16 | 6,8 | | |
| | | | | | | 20 | 7,7 | | |
| Graines de soja déshuilées par CO₂ SC (2%mass huile) (Montanari et al., 1999) | 4,5 | 80 / 16,6-68,9 | 2.10 ^{-3**} | 30 | | (% EtOH) | (mg de PL extraits.g ⁻¹ graine déshuillée) | | |
| | | 70 / 23,9-68,9 | | | | 10 | 0,1 à 7,2 | | |
| | | 60 / 23,9-68,9 | | | | 10 | 1,0 à 10,8 | | |
| | | | | | | 10 | 0,7 à 8,2 | | |
| Œuf ou jaune d'œuf lyophilisé délipidé par CO₂ SC (Shah et al., 2004) | 10 | 45 / 41,4 | 5,0* | 40 | 200 | (%mol EtOH) | (analyse partie lipidique de la fraction) | | |
| | | 45 / 41,4 | | 60 | | 58 | 6,1% LN / 86,4% PL | | |
| | | 45 / 41,4 | | Non indiqué | | 58 | 3,2% LN / 93,2% PL | | |
| | | 60 / 41,4 | | Non indiqué | | 5 à 20 | Aucun phospholipide | | |
| | | | | | | 50 | 49 g de PC.kg ⁻¹ d'œuf | | |
| Œuf de saumon lyophilisé (Tanaka et al., 2004) | 4 | 33 / 17,7 | 3,15.10 ^{-3***} | 240 | 10 | (%vol EtOH) | (% de TG extraits) | (% de PL extraits) | |
| | | 33 / 17,7 | 3,3.10 ^{-3***} | | | 5 | 80% | | 0% |
| | | | 3,45.10 ^{-3***} | | | 10 | 92% | | 30% |
| | | | 3,6.10 ^{-3***} | | | 15 | 97% | | 66% |
| | | | 20 | 99% | 80% | | | | |
| | | | Variation au cours de l'extraction | 240 / | 5 / | ~80% | 0% | | |
| | | | | 60 / | 5-20 / | TG : PL => 2 : 1 | PL presque tous extraits | | |
| | | 180 | 20 | | | | | | |
| Graines et gruau d'avoine déshuillée par CO₂ SC (Aro et al., 2007) | 1 000 | 70 / 40 | 2,5.10 ^{-1****} + 10 L EtOH | 360 | 30000 | 10%mass EtOH | PL extraits puis utilisés dans un procédé de type anti-solvant | | |

| Echantillon | m _{chargée} (g) | T / P (°C / MPa) | Débit (L.min ⁻¹) | Temps (min) | Réacteur (mL) | Co-solvant | Résultats |
|---|-----------------------------|-------------------------------|---|----------------|------------------|---|--|
| Jaune d'œuf en poudre (Aro et al., 2009) | 2 000 | 70 / 40 | 4,5.10 ⁻¹ **** +2,5.10 ⁻² (EtOH) | 300 | | 12%mass EtOH | Rendement d'extraction de PL de 15% |
| Boues activées microbiennes (Hanif et al., 2010) | - | 80 / 25 | 2,7.10 ⁻³ *** | 15 | 1 | (%vol) 0 10 (Hx) 10 (CHCl ₃) 10 (EtOH) 10 (Acétone) 10 (MeOH) | (nmol de PLFA.mg ⁻¹ de boues) 0,5 3,4 4,3 5,4 6 7,3 |
| | | 80 / 25 | 2,7.10 ⁻³ *** | 15 | | 1 à 20 (MeOH) | 3 à 7 |
| | | 80 / 10-30 | 2,7.10 ⁻³ *** | 15 | | 10 (MeOH) | 6,0 à 7,0 |
| | | 25-120 / 25 | 2,7.10 ⁻³ *** | 15 | | 10 (MeOH) | 1,8 à 6 |
| | | 80 / 25 | 2,7.10 ⁻³ *** | 5 à 25 | | 10 (MeOH) | 4,5 à 7,3 |
| Jaune d'œuf lyophilisé Culot jaune d'œuf lyophilisé Crème hydrolysé par Protéase II Crème hydrolysé par Protéase P (Navidghasemizad et al., 2014) | 2 à 3,5 | 70 / 48,3 | 1,0* 0,2.10 ⁻³ (EtOH) | 360 | 300 | 8%mol EtOH | (% de PL extraits) 49% 25% 75% 86% |
| | | | | | | | (% de PC extraits) 47% 40% 72% 85% |
| Déchets de la St Jacques (Subra et al., 2015) | 6 | 45 / 25 45 / 25 27 / 25 | 1,0 g.min ⁻¹ co-solvant : 0,2.10 ⁻³ -1,2.10 ⁻³ | 130 | 10 | (%mass) 30 (EtOH) 15 (EtOH) 50 (propanol) | (mg de PL.g ⁻¹ de fluide) 2,6 0,5 1,0 |

*Débit volumique du CO₂ mesurée à l'état gaz (1.10⁻¹ MPa et 20°C)**Débit volumique pour le mélange CO₂-EtOH***Débit volumique du CO₂, mais dans des conditions non indiquées****Débit volumique du CO₂ mesurée à l'état liquide

*****%PL extraits = g de PL extraits pour 100 g de PL présents dans la graine

LN : lipide neutre ; PL : phospholipide ; P : phosphore ; PC : phosphatidylcholine ; TAG : triglycéride ; EtOH : éthanol ; MeOH : méthanol ; Hx : hexane ; CHCl₃ : chloroforme ; IPA : isopropanol ; PLFA : acides gras des phospholipides.

En conclusion, le CO₂ supercritique peut être utilisé dans l'extraction des lipides à partir de tout type de matrice. La plupart des études se focalisent sur la composition en acides gras des lipides extraits, mais quelques-unes présentent également des résultats sur d'autres molécules lipophiles intéressantes comme les tocophérols et les carotènes. Pour extraire les lipides polaires tels que les phospholipides, il est nécessaire d'ajouter au moins 10% de co-solvant dans le fluide extractant. Pour des raisons d'alimentarité, l'éthanol est le co-solvant de choix pour une utilisation des lécithines en agro-alimentaire. Une étape de déshuilage est aussi préconisée pour produire des fractions pures en phospholipides (Montanari et al., 1996 ; Shah et al., 2004) et ainsi cibler une application.

III. Liposomes/Ethosomes

III.1 DEFINITION ET APPLICATION DES LIPOSOMES

III.1.1 Vésicule lipidique ou liposome

La nature amphiphile des phospholipides est à l'origine de leur propriété à s'auto-assembler en phase aqueuse. Les phospholipides s'agencent de manière à minimiser les interactions entre les composants hydrophobes et les molécules d'eau. Ainsi, en milieu aqueux, les queues apolaires se regroupent au centre d'une bicouche et les têtes polaires sont exposées au milieu aqueux (Figure 1.10). Les phospholipides forment ainsi une particule sphérique appelée liposome (Franzen and Østergaard, 2012). Les liposomes sont des structures fermées, constituées d'une ou plusieurs bicouches, de diamètre compris entre quelques nanomètres à plusieurs dizaines de micromètres. La classification des liposomes est fondée principalement sur leur taille et leur nombre de bicouches (Dua et al., 2012 ; Lorin et al., 2004 ; Šegota and Težak, 2006) (Figure 1.10).

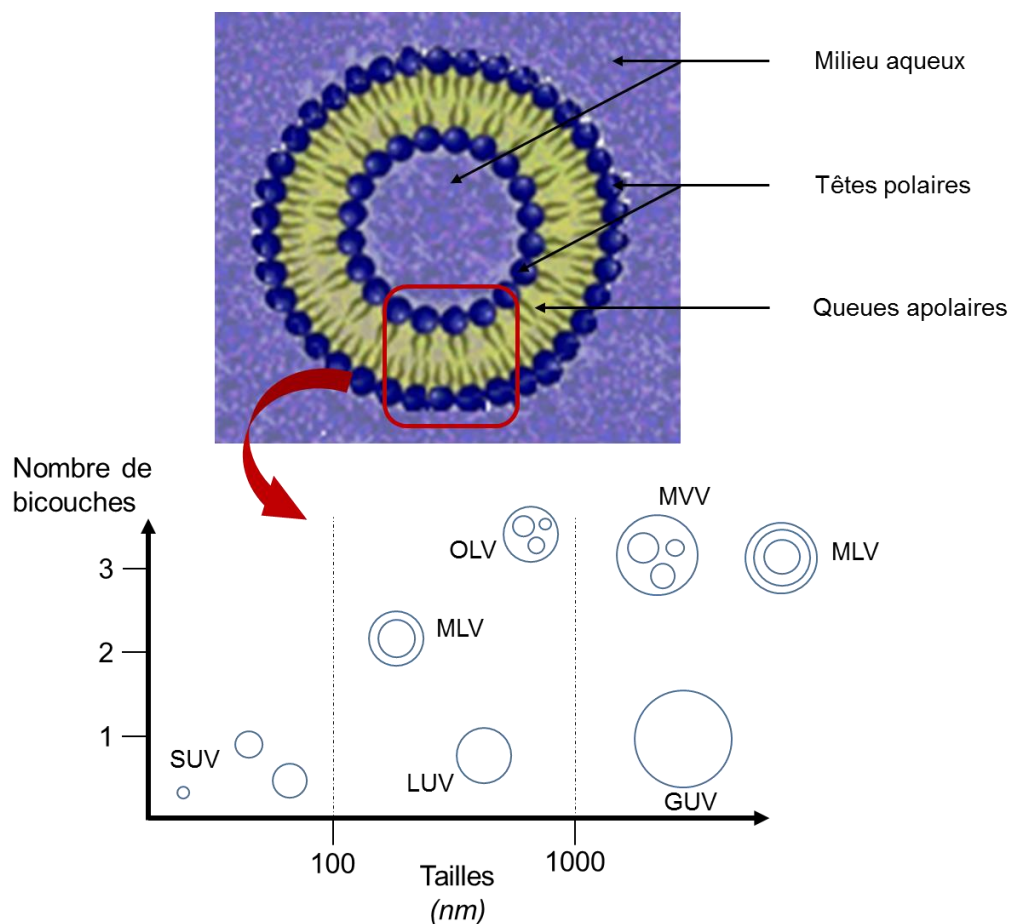


Figure 1.10 : Schéma d'un liposome et classification (adapté de Dua et al., 2012 et Lorin et al., 2004).
SUV : Vésicule unilamellaire de petite taille ; LUV : Vésicule unilamellaire large ; GUV : Vésicule unilamellaire géante ; MLV : Vésicule multilamellaire ; OLV : Vésicule oligolamellaire ; MVV : Vésicule multivésiculaire.

III.1.2 Applications des liposomes

Rapidement après leur découverte dans les années 1960, les liposomes sont utilisés comme modèle membranaire pour mimer les systèmes cellulaires afin de comprendre les mécanismes de transport de molécules à travers la membrane, les propriétés de perméation et les cinétiques d'adhésion et de fusion cellulaires (Bangham, 1978 ; Wagner and Vorauer-Uhl, 2011). Parallèlement, les liposomes permettent d'incorporer des molécules lipophiles dans la bicouche membranaire et d'encapsuler des molécules hydrophiles dans le compartiment interne aqueux. Associés à leur nature non toxique et biodégradable, les liposomes sont rapidement utilisés comme systèmes de vectorisation de molécules actives dès le début des années 1970 pour des applications pharmaceutiques (Gregoriadis et al., 1971). Par exemple, la morphine a été encapsulée dans des liposomes multilamellaires. Sa diffusion lente et continue à travers les bicouches prolonge l'effet du principe actif et permet de réduire sa concentration locale (Lorin et al.,

2004). Un autre exemple concerne l'encapsulation de molécules anticancéreuses permettant de réduire leur toxicité et donc leurs effets secondaires. Aujourd'hui, suite aux progrès réalisés dans la formulation des liposomes, ils sont utilisés dans le traitement de maladies telles que le cancer avec la commercialisation du Doxil de chez Sequus ou DaunoXome de chez Gildead (Akbarzadeh et al., 2013 ; Dua et al., 2012 ; Wagner and Vorauer-Uhl, 2011). Les liposomes sont aussi étudiés pour le traitement du virus de l'immunodéficience humaine (Désormeaux and Bergeron, 1998), et des maladies fongiques ou bactériennes (Dua et al., 2012), dans la thérapie génique (Yang et al., 2014) et la vaccination (Gregory et al., 2013). Au niveau de la peau, les Marinosomes, liposomes formulés à partir de lécithine marine, pourraient être utilisés dans le traitement de maladies inflammatoires de la peau (psoriasis, par exemple) de par leur teneur importante en AGPI n-3 (EPA et DHA) (Moussaoui et al., 2002).

Les liposomes pourraient être employés en agro-alimentaire. Des études montrent leur intérêt pour l'encapsulation d'enzymes (flavourzyme, protéase fongique pour accélérer la maturation des fromages, lactase pour améliorer la digestion du lactose), de vitamines (vitamines A, B2, B12 ou C pour l'enrichissement des aliments) et de probiotiques (Keller, 2001 ; Marsanasco et al., 2011). L'utilisation des liposomes permet une meilleure dispersion des molécules dans des matrices alimentaires complexes, limite la dégradation des molécules d'intérêt au cours du procédé de fabrication (chauffage, cisaillement) du stockage ou des conditions du milieu gastro-intestinal dans le cas de probiotiques. Cependant, le coût des PL et le manque de procédés de préparation à grande échelle restent encore un frein à leur utilisation dans l'industrie agro-alimentaire (Singh and Thompson, 2012).

Enfin, les liposomes sont appliqués comme systèmes vésiculaires en cosmétique. Les liposomes peuvent contribuer à l'amélioration de l'état d'hydratation de la peau (Betz et al., 2005). En effet, ils apportent de l'eau par leur volume interne aqueux et via l'hydratation des têtes polaires des phospholipides. Ils empêchent l'évaporation transcutanée en créant un film hydrolipidique à la surface du *stratum corneum*. Les liposomes, par leur membrane, permettent aussi l'apport de lipides participant à la fonction de barrière contre la perte insensible en eau. Il peut s'agir de lipides structuraux entrant dans la composition des espaces interconéocytaires du *stratum corneum* comme le cholestérol, ou de lipides fonctionnels comme des acides gras essentiels véhiculés sous forme de phospholipides. Enfin, en tant que vecteurs de principes actifs, les liposomes peuvent : (i) augmenter la pénétration cutanée d'une molécule par la formation d'un réservoir, ce qui prolonge la durée d'action de l'actif encapsulé ; (ii) augmenter la pénétration cutanée de molécules hydrosolubles qui ne passent pas la barrière cutanée facilement (vitamine C, par exemple) ; (iii) permettre un relargage prolongé d'un principe actif pour potentialiser son effet dans le temps.

III.2 ETHOSOMES

Les liposomes sont peu performants pour délivrer des composés actifs à travers les couches de la peau et atteindre leur cible biologique. En effet, la peau est un organe constitué de trois tissus superposés : l'épiderme, le derme et l'hypoderme. La surface de l'épiderme est constituée d'une couche appelée *stratum corneum* (épaisseur entre 10 et 20 μm) (Figure 1.11). Il est composé de plusieurs couches de cellules mortes (cornéocytes remplis de kératine) enveloppées dans un mélange complexe de lipides (céramides, cholestérol et acides gras libres) (van Smeden et al., 2014) (Figure 1.11). Le *stratum corneum* constitue la première barrière contre les agressions extérieures et contre la perte insensible en eau de l'organisme.

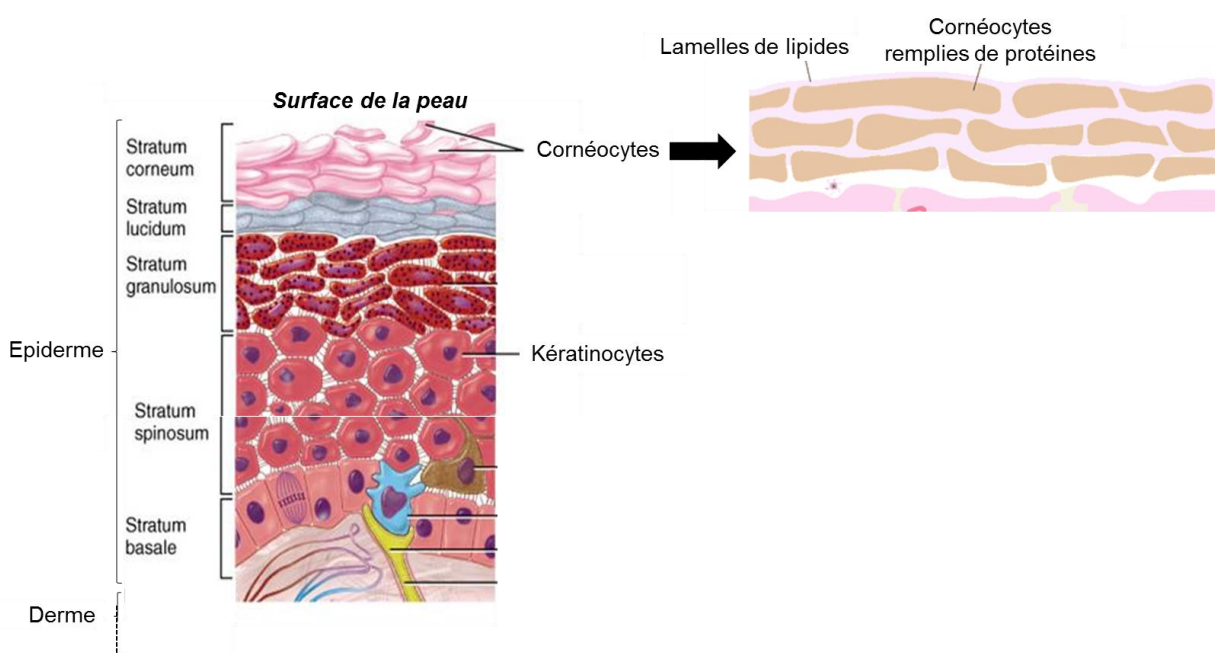


Figure 1.11 : Différentes couches de la peau et détail du *stratum corneum*.

L'interaction des liposomes avec le *stratum corneum*, voir leur internalisation, est fortement dépendante de la composition en lipides des liposomes. Par exemple, la présence de dioléylphosphatidyléthanolamine dans la composition des liposomes augmente leur pénétration au travers du *stratum corneum* d'un facteur 2 ou 3. A l'inverse, la présence de cholestérol n'affecte pas leur pénétration (Kirjavainen et al., 1996). De plus, les interactions entre le *stratum corneum* et les liposomes peuvent varier suivant l'état physique de la bicouche lipidique (van Den Bergh et al., 1998). Les liposomes dont les membranes sont dans l'état « gel » pourraient être plus aptes à former un film hydrolipidique à la surface du *stratum corneum*. A l'inverse, les liposomes dont l'état membranaire est « liquide » pénétreraient plus facilement dans les couches du *stratum corneum* (van Den Bergh et al., 1998).

Une approche pour améliorer les interactions liposomes/peau est représentée par les éthosomes (Touitou et al., 2000). Les éthosomes sont des vésicules phospholipidiques en suspension dans un mélange eau-éthanol (max. 60% d'éthanol) (Jain et al., 2007 ; Touitou et al., 2000). Les éthosomes ont une capacité de pénétration de la peau 87 fois plus importante que celle des liposomes de PC (Dayan and Touitou, 2000). La présence d'éthanol permettrait d'améliorer la pénétration des liposomes en favorisant leur passage par les zones inter-membranaires polaires du *stratum corneum* (Ganem-Quintanar et al., 1997). En effet, à la température physiologique, les couches de lipides présentes dans le *stratum corneum* sont très denses et hautement ordonnées. L'éthanol diminuerait la température de fusion de ces lipides, augmentant leur fluidité, et permettant ainsi la création de zones privilégiées pour le passage des liposomes (Touitou et al., 2000).

III.3 METHODES DE PREPARATION DES LIPOSOMES

Les méthodes de préparation des liposomes peuvent se diviser en deux grandes familles : les méthodes dites conventionnelles et les méthodes dites alternatives. Ces dernières se basent sur :

- La technologie des fluides supercritiques (Honda, 2011 ; Lesoin, 2011)
- La technologie de la microfluidique (Meure et al., 2008a; Patil and Jadhav, 2014)
- La méthode du contacteur membranaire (Huang et al., 2014; Meure et al., 2008a; Patil and Jadhav, 2014)

Ces techniques sont intéressantes car elles permettent de pallier à l'emploi de solvants organiques. Néanmoins, elles utilisent des appareillages très spécifiques et restent encore au stade de recherche. C'est pourquoi, elles ne seront pas développées dans ce manuscrit.

La figure 1.12 présente les principales techniques conventionnelles utilisées pour la préparation des liposomes.

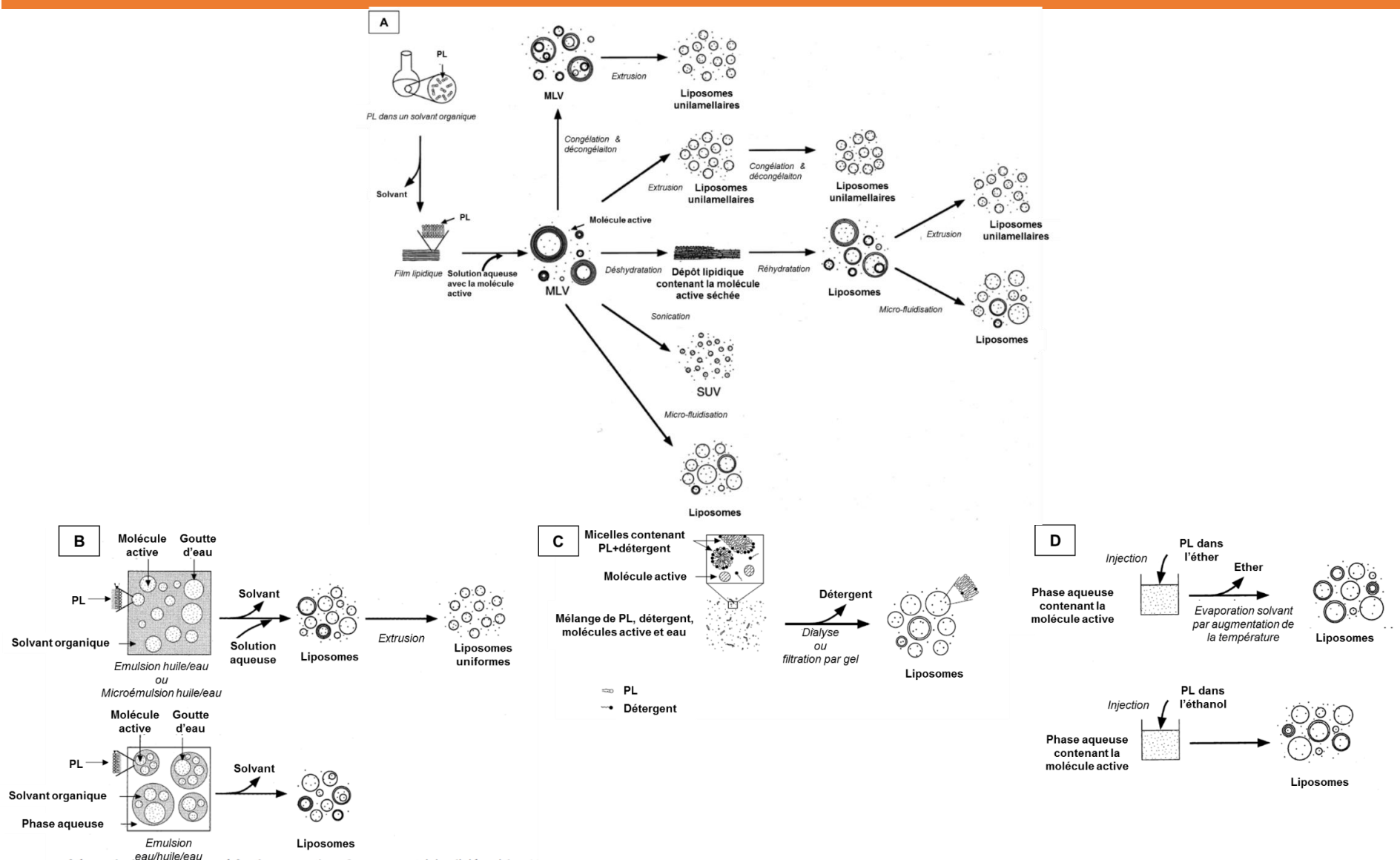


Figure 1.12 : Techniques conventionnelles de formation des liposomes. A : par formation d'un film phospholipidique et hydratation ; B : par émulsion et évaporation du solvant ; C : par élimination du détergent ; D : par injection de solvant (Walde and Ichikawa, 2001).
 PL : Phospholipides ; SUV : Vésicule unilamellaire de petite taille ; MLV : Vésicule multilamellaire.

III.3.1 Hydratation d'un film phospholipidique ou méthode de Bangham

La méthode de Bangham consiste à solubiliser les phospholipides dans un solvant organique, avant d'être évaporé jusqu'à la formation d'un film phospholipidique. Ce film est ensuite hydraté par l'ajout d'une solution aqueuse tout en maintenant une agitation nécessaire au détachement des couches lipidiques (Figure 1.12.A). Les liposomes obtenus sont multilamellaires avec une taille de l'ordre de quelques micromètres. Il s'agit d'une technique simple, dont le point crucial reste la qualité du film lipidique à former.

Cette méthode a été récemment adaptée en utilisant une centrifugation à double axe de rotation à la place de l'agitation. La rotation principale pousse la suspension de phospholipides dans une direction extérieure en réponse à la force centrifuge, tandis que la rotation du récipient en verre sur lui-même pousse l'échantillon dans la direction opposée à cause de l'adhésion entre l'échantillon et la surface en verre. Si l'adhésion de l'échantillon à la surface du verre est suffisante (qualité du film lipidique) et que l'échantillon est assez visqueux, cela permet d'homogénéiser l'échantillon. Un gel visqueux contenant les liposomes est obtenu en fin de procédé, qui peut ensuite être dilué à façon (Massing et al., 2008; Pantze et al., 2014).

III.3.2 Préparation des liposomes à partir de micelles inverses

Les phospholipides sont solubilisés dans un solvant organique. Des gouttelettes d'eau sont dispersées sous forte agitation dans le solvant, produisant ainsi des micelles inverses. L'élimination lente du solvant organique mène à une réorganisation de ces micelles sous forme de gel. Le gel collapse. L'excès de phospholipides dans l'environnement contribue à la formation de bicouches autour des micelles résiduelles, puis à la formation de liposomes (Akbarzadeh et al., 2013) (Figure 1.12.B). Les liposomes obtenus sont unilamellaires ou multilamellaires selon la concentration des phospholipides.

Une variante de cette méthode consiste à former une émulsion double avant l'évaporation du solvant. Une faible quantité d'eau est ajoutée à une grande quantité de phase organique contenant les phospholipides solubilisés sous une forte agitation. Spontanément, les phospholipides se mettent à l'interface pour former une monocouche lipidique. Ensuite, l'émulsion simple est transformée en une émulsion double en ajoutant le mélange précédent à un excès d'eau. Un flux de diazote, barbotant dans l'émulsion double permet d'éliminer le solvant organique et de former des liposomes unilamellaires (Figure 1.12.B).

III.3.3 Elimination du détergent de micelles mixtes

Dans cette méthode, les phospholipides sont d'abord solubilisés dans des micelles mixtes lipides/tensio-actifs dans un milieu aqueux. En éliminant le tensio-actif à vitesse contrôlée, les micelles s'appauvrissent en tensio-actifs et changent de forme jusqu'à se courber suffisamment pour former des vésicules unilamellaires de grande taille (LUV) (Akbarzadeh et al., 2013) (Figure 1.12.C). L'élimination du détergent peut se faire par dialyse, par chromatographie d'exclusion-diffusion ou par adsorption sur des résines hydrophobes. Cependant, cette méthode de préparation reste longue à réaliser. De plus, la présence de tensio-actif résiduel dans la phase aqueuse et/ou dans les bicouches peut être problématique selon le domaine d'application visé.

III.3.4 Techniques d'injection

Deux approches d'injection sont possibles : soit l'injection d'une solution de PL dans l'eau, soit l'injection d'eau dans une solution de PL.

Dans le premier cas, les phospholipides dissous dans de l'éthanol ou de l'éther sont injectés dans une solution aqueuse chauffée. L'évaporation progressive du solvant est accompagnée par la formation de liposomes (Figure 1.12.D). Les liposomes obtenus sont hétérogènes (30 à 110 nm pour l'éthanol et 70 à 200 nm pour l'éther) et unilamellaires (Akbarzadeh et al., 2013). L'évaporation de l'éthanol est plus problématique que celle de l'éther. En effet, sur le diagramme binaire eau/éthanol, une forme azéotropique existe et limite ainsi la séparation de l'éthanol avec l'eau (Akbarzadeh et al., 2013). En substituant l'éther à l'éthanol, la technique est plus performante. En effet, l'éther non-miscible avec l'eau est éliminé par simple chauffage, mais cette élimination reste difficilement contrôlable.

Dans le second cas, le principe repose sur la diminution de la solubilité des composés colloïdaux dans le solvant organique par l'ajout d'un solvant aqueux (Saegusa and Ishii, 2002). C'est cette technique qui est utilisée pour la préparation des éthosomes. Les phospholipides en solution dans l'éthanol sont introduits dans un récipient en verre. L'eau est ajoutée au goutte à goutte à la solution phospholipidique et mélangée par agitation (Ishii et al., 1995). D'une solution limpide où les phospholipides sont solvatés par les molécules d'alcool, on passe à une solution turbide où les vésicules phospholipidiques (ou coacervats) se forment. Au début de la coacervation, les phospholipides viennent se placer dans la phase de séparation. A ce moment-là, les répulsions électriques sont faibles parce qu'il n'y a pas suffisamment de molécules d'eau pour dissocier les têtes polaires des molécules d'alcool. Par la suite, ces forces de répulsion vont être de plus en plus importantes permettant ainsi de disperser les liposomes dans le milieu hydro-alcoolique. Deux mécanismes vont entrer en compétition à savoir les forces de répulsion via les charges présentes à la surface des liposomes, mais aussi la couche de solvation qui va jouer sur l'agrégation des vésicules (Saegusa and Ishii, 2002). Si l'élimination de l'éthanol n'est pas complète, des éthosomes sont obtenus.

Les méthodes conventionnelles sont des méthodes simples à mettre en œuvre, comportant plusieurs étapes. Elles s'opèrent sur de petits volumes et sont surtout utilisées au niveau du laboratoire. Néanmoins, certaines méthodes comme la méthode de Bangham sont extrapolables au niveau industriel. Des solvants organiques potentiellement toxiques comme le chloroforme sont généralement utilisés pour la formation du film. Ce solvant tend à être remplacé par de l'éthanol, qui est un moins bon solvant des PL.

Pour les techniques aboutissant à la formation de liposomes multilamellaires, un post-traitement peut être appliqué afin de réduire la taille des liposomes formés ou de modifier leur lamellarité. Les techniques les plus courantes sont la sonication, l'extrusion sur membrane ou encore l'homogénéisation à l'aide d'un microfluidiseur. Il est aussi possible d'ajouter en fin de procédé une étape de lyophilisation. L'ajout de cryoprotectant permet de diminuer significativement la taille des liposomes. Une poudre est obtenue suite à la lyophilisation, qui peut être réhydratée pour former des liposomes (Huang et al., 2014 ; Meure et al., 2008a).

IV. OBJECTIFS DE LA THESE

L'étude bibliographique a d'abord mis en évidence que les lécithines commerciales sont extraites d'un nombre limité de matrices végétales (soja, tournesol, colza) ou animales (œuf, lait et sources marines). La plupart de ces lécithines se caractérisent par la présence des mêmes familles d'acides gras : AG saturés (AGS), AG monoinsaturés (AGMI) et AGPI n-6. Seules les lécithines extraites de sources marines sont riches en AGPI n-3 à très longues chaînes (EPA et DHA), dont le marché est dominé par l'exploitation du krill et des œufs de poisson. L'un des objectifs de ce travail de thèse est **d'identifier de nouvelles sources de phospholipides qui soient également riches en AGPI n-3**. Dans un souci de valorisation de co- et sous-produits, les sources de phospholipides visées sont des tourteaux végétaux, co-produits de l'huilerie valorisés à l'heure actuelle en alimentation animale, et un déchet de produits halieutiques : les sous-produits de la coquille Saint Jacques, qui ont montré des potentialités en termes de teneur en PL et de composition en AGPI n-3 (Thong Deng, 2011). Compte-tenu de la complexité des lipides présents dans ces sources, cette partie de l'étude a nécessité le développement analytique de différentes méthodes complémentaires dans le but d'obtenir une cartographie la plus complète de la lipidomique de ces sources potentielles.

L'étude bibliographique a également montré les potentialités de l'extraction utilisant le CO₂ supercritique pour extraire les lipides et principalement les triacylglycérols. En effet, cette méthode pourrait avantageusement se substituer à l'utilisation de solvants organiques en termes de développement durable et de responsabilité sociétale. Néanmoins, il est aussi apparu que très peu d'études se focalisaient sur les PL. L'un des objectifs de ce travail de thèse est de **déterminer quelles conditions opératoires sont les plus favorables à l'obtention d'extraits riches et/ou purs en PL**.

Enfin, nous nous sommes intéressés aux possibilités de formulation des PL extraits, sous la forme de liposomes. Cette étude passe par la mise au point de la préparation de ces systèmes ainsi que leur caractérisation. L'objectif de cette partie est de montrer que la diversité en composition des extraits obtenus permet d'**obtenir des liposomes aux caractéristiques physico-chimiques variées**. Par ailleurs, il s'agit aussi de déterminer la faisabilité de préparation de liposomes à partir d'extraits supercritiques éthanoliques.

Les trois chapitres de la partie Résultats et discussion sont menés pour répondre à ces trois objectifs. L'originalité de cette étude repose sur une approche transversale et pluridisciplinaire, allant de la source à valoriser jusqu'à la formulation des molécules extraites, en passant par la mise au point des conditions d'extraction des lipides utilisant une technologie « verte » et celle de techniques analytiques pertinentes pour déterminer la composition des extraits.

Les caractérisations des lipides totaux et des extraits supercritiques sont obtenues grâce à de nombreuses collaborations :

- au sein du laboratoire CBMN avec :

- Axelle Grélard et Estelle Morvan, responsables de la plateforme RMN (Equipe E. Dufourc) ;
- Corinne Buré pour l'analyse des classes et espèces de phospholipides par la spectrométrie de masse (MS) couplée ou non à la chromatographie liquide en phase inverse (LC-IP) (Equipe J-M. Schmitter).

- des équipes de l'université Paris-Saclay :

- Pierre Chaminade, responsable de l'unité universitaire Lip(Sys)² et de la plateforme SAMM et Sonia Abreu (Lip(Sys)²) pour l'analyse des lipides neutres et acides gras libres par chromatographie liquide couplée soit au détecteur évaporatif à diffusion de lumière ou soit à la spectrométrie de masse ;
- Audrey Solgadi, responsable technique de la plateforme SAMM, chargée de l'analyse des espèces de phospholipides par chromatographie liquide en phase normale (LC-NP) couplée à la spectrométrie de masse.

Chapitre 2 : *Matériel et méthodes*

I. Matériel

I.1 MATÉRIELS VÉGÉTAUX ET ANIMAUX

I.1.1 Tourteaux d'oléagineux

Les tourteaux d'oléagineux sont issus d'une première extraction de l'huile par pressage mécanique à froid, à partir de fruits et graines oléagineux issus de l'agriculture biologique. Cinq tourteaux différents sont fournis par Bioplanète (France) et un tourteau est fourni par l'Iterg (France). Les tourteaux sont conservés sous vide à -20°C pour empêcher tout risque d'oxydation des lipides. Les caractéristiques des différents tourteaux sont données dans le tableau 2.1.

Tableau 2.1 : Caractéristiques des tourteaux d'oléagineux (données fournisseur).

| Nom du tourteau | Lin | Chanvre | Cameline | Sésame | Noix | Cameline |
|--|------------|------------|------------|------------|------------|----------|
| Fournisseur | Bioplanète | Bioplanète | Bioplanète | Bioplanète | Bioplanète | Iterg |
| Humidité (103°C) (g _{eau} . 100 g ⁻¹) | ≤12 | ≤12 | ≤12 | ≤10 | ≤10 | - |
| Extrait sec (g. 100 g ⁻¹) | ≥90 | ≥80 | ≥89 | ≥90 | ≥89 | - |
| Matière grasse (g. 100 g ⁻¹) | ≤12 | ≤12 | ≤14 | ≤25 | ≤45 | - |

I.1.2 Sous-produits de la coquille Saint Jacques

La coquille Saint Jacques provient de la côte Atlantique française et est fournie par un poissonnier local. Après la collecte de la partie non vendue (manteau, branchies, foie et pied), celle-ci est lavée à l'eau claire pour enlever le sable et les morceaux éventuels de coquille encore présents. Un broyage sous vide avec une lame lisse à vitesse de rotation de 1 500 tr.min⁻¹ est ensuite effectué (Robot coupe R8/ Pompe à vide Mils). Les échantillons broyés sont congelés et stockés à -20°C avant la zéodratation (Figure 2.1).

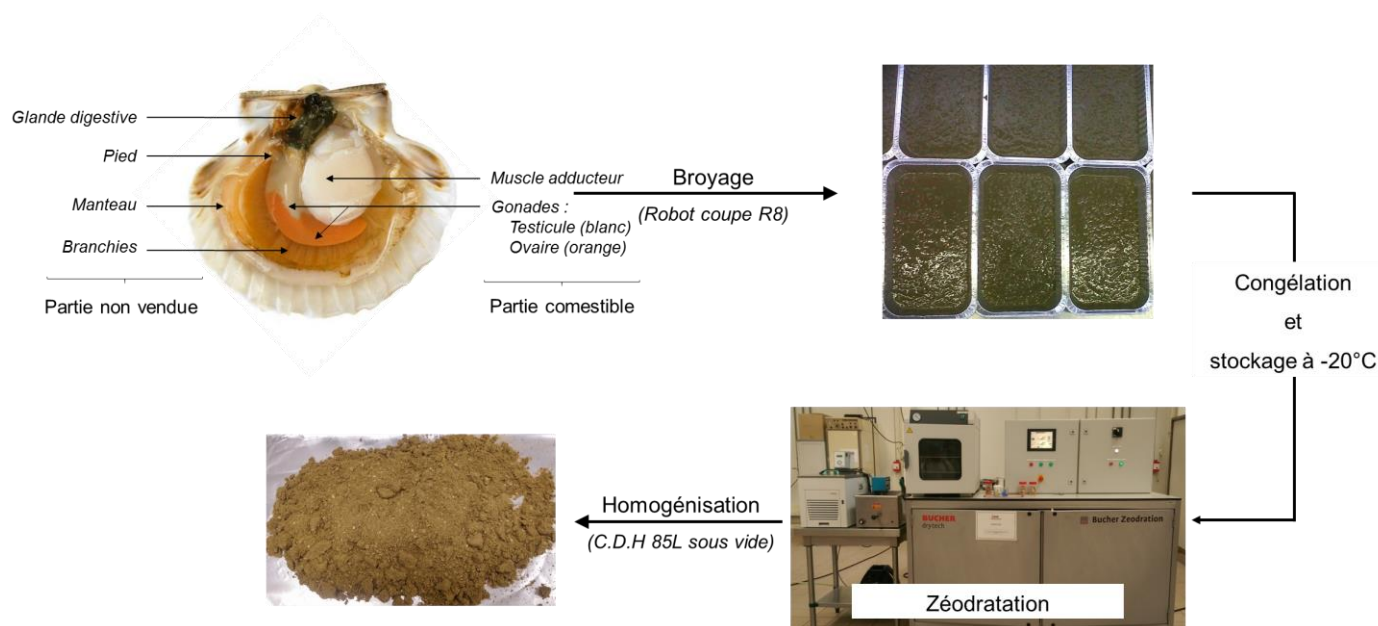


Figure 2.1 : Protocole de conditionnement des sous-produits de la coquille Saint Jacques.

La zéodratation, une lyophilisation avec adsorbants, est une opération de déshydratation à basse température qui consiste à éliminer l'eau par sublimation. Cela permet une conservation à long terme de la matière première grâce à un abaissement de l'activité de l'eau du produit. Un zéodrateur (Bucher drytech, Suisse) comprend trois éléments : une source chauffante, une pompe à vide et un piège de récupération d'eau (Figure 2.2). Ce piège à eau est constitué par des zéolites dont le diamètre des pores est précisément calibré à 4 Å. Ce diamètre est légèrement supérieur à celui d'une molécule d'eau ce qui permet l'absorption spécifique de l'eau des produits à déshydrater. La séquence de séchage se déroule de la manière suivante : 6 barquettes alimentaires contenant 428 ± 60 g de matière broyée congelée sont introduites dans l'enceinte. La pression est diminuée fortement et maintenue à une valeur de 1.10^{-4} MPa pendant toute l'opération. L'apport de chaleur pour réaliser la sublimation de l'eau se fait par conduction via les plaques chauffantes sur lesquelles sont posées les barquettes (Figure 2.1). Au début de l'opération, les plaques sont chauffées à 40°C pour aider à la sublimation de l'eau. Au cours du temps, la température du produit augmente et pour éviter que celle-ci ne soit trop élevée, la température des plaques est abaissée jusqu'à 25°C (température ambiante). La durée de l'opération est de 24 h.

Après zéodratation, l'ensemble du contenu des barquettes est homogénéisé sous vide (Cutter sous vide « C.D.H » 85 L, Chantalat, France), avant d'être aliquoté et stocké à -20°C.

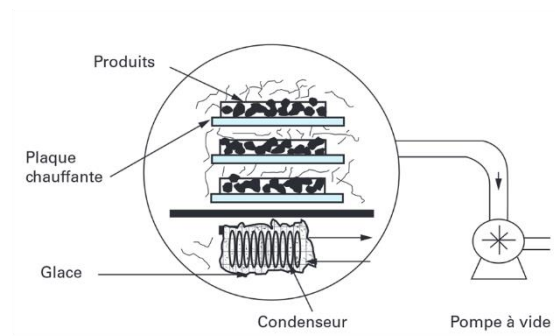
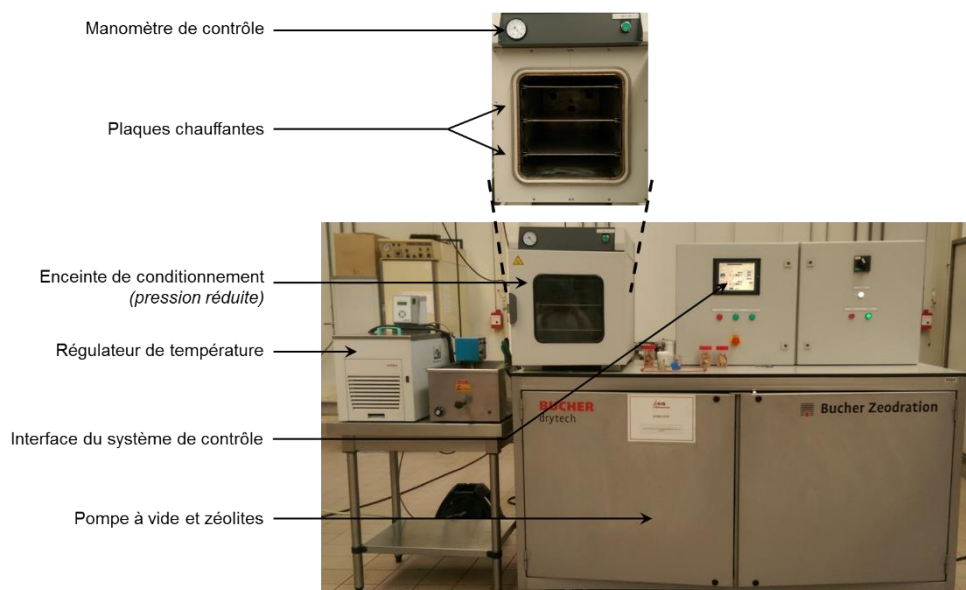


Figure 2.2 : Zéodrateur et principe de la zéodratation (Marin and René, 2000).

I.2 LIPIDES DE REFERENCE

I.2.1 Lipides

Le tableau 2.2 regroupe les différents lipides utilisés et précise le cadre de leur utilisation.

Tableau 2.2 : Caractéristiques des lipides utilisés.

| Classe de PL | Espèce de PL | Origine | Utilisation | Fournisseur |
|------------------------------|---|------------------|------------------------|-----------------------|
| MAG | 18:0 | | Standard DEDL | Sigma Aldrich |
| DAG | 16:0 | | Standard DEDL | Sigma Aldrich |
| TAG | 18:0 | | Standard DEDL | Sigma Aldrich |
| Cholesteryl palmitate | | | Standard DEDL | Sigma Aldrich |
| AGL | 18:0 | | Standard DEDL | Sigma Aldrich |
| PE | 17:0/17:0 | Synthétique | Etalon interne MS | Avanti Polar Advanced |
| | 18:3/18:3 | Synthétique | Validation de méthodes | Avanti Polar Advanced |
| | | Jaune d'œuf | Etalon interne MS | Sigma Aldrich |
| PS | 17:0/17:0 | Synthétique | Etalon interne MS | Avanti Polar Advanced |
| | | Cerveau de bovin | Etalon interne MS | Sigma Aldrich |
| PC | 17:0/17:0 | Synthétique | Etalon interne MS | Avanti Polar Advanced |
| | 18:3/18:3 | Synthétique | Validation de méthodes | Avanti Polar Advanced |
| | | Jaune d'œuf | Etalon interne MS | Sigma Aldrich |
| PA | 17:0/17:0 | Synthétique | Etalon interne MS | Avanti Polar Advanced |
| | Mélange de PA contenant du 16:0 ; 16:1 ; 18:0 ; 18:1 ; 18:2 ; 20:4 ; 22:6 | Jaune d'œuf | Validation de méthodes | Avanti Polar Advanced |
| PI | 17:0/14:1 ^a | Synthétique | Etalon interne MS | Avanti Polar Advanced |
| | | Soja | Etalon interne MS | Sigma Aldrich |
| PG | 18:3/18:3 | Synthétique | Validation de méthodes | Avanti Polar Advanced |
| | 17:0/17:0 | Synthétique | Etalon interne MS | Avanti Polar Advanced |
| | | Jaune d'œuf | Etalon interne MS | Sigma Aldrich |
| LPC | | Jaune d'œuf | Etalon interne MS | Sigma Aldrich |
| CL | | Cœur de bovin | Etalon interne MS | Sigma Aldrich |

^a PI 17:0/14:1 signifie que l'acide gras 17:0 et l'acide gras 14:1 sont respectivement estérifiés en position sn-1 et sn-2.

AGL : acides gras libres ; MAG : monoglycérides ; DAG : diglycérides ; TAG : triglycérides ; PL : phospholipides ; PE : phosphatidyléthanolamine ; PS : phosphatidylsérine ; (L)PC : (lyso)phosphatidylcholine ; PA : acide phosphatidique ; PI : phosphatidylinositol ; PG : phosphatidylglycérol ; CL : cardiolipine ; MS : spectrométrie de masse.

I.2.2 Lécithines

Les lécithines sont utilisées soit comme standard pour la chromatographie sur couche mince, soit pour la formulation de liposomes/éthosomes. Les lécithines de soja proviennent de deux sociétés : Novastell (France) et Lipoïd (Allemagne). La lécithine marine est fournie par la société Phosphotech (France). La composition des lécithines de soja et marine est présentée dans le tableau 2.3.

Tableau 2.3 : Composition en lipides des lécithines commerciales utilisées et composition en acides gras majoritaires.

| | Lécithines de soja | | Lécithine marine |
|---|---|-----------------------------|-----------------------------|
| | Lecisoya P97 ^a <i>Novastell</i> | Lipoid P30 <i>Lipoid</i> | LC 60 <i>Phosphotech</i> |
| Phospholipides (%mass) | 68 | 97 | 69 |
| PC | 19 | 47 | 44 |
| PE | 13 | 18 | 21 |
| PI | 16 | 21 | 1 |
| PA | 8 | - | - |
| PS | - | 9 | 2 |
| Autres | 12 | 7 | 1 |
| Glycolipides | 29 | - | - |
| Cholestérol | - | - | 27 |
| Triglycérides | 3 | 3 | 4 |
| Composition en acides gras (%mass) | | | |
| AGS | 25,8 | 20 - 26 | 33,4 |
| AGMI | 17,7 | 6 - 11 | 7,4 |
| AGPI | 56,5 | 62 - 68 | 59,2 |
| n-3 | 7,2 | - | 96,5 |
| n-6 | 92,8 | - | 3,5 |

^a Lécithine utilisée comme standard pour la CCM et pour la formulation de liposomes/éthosomes.

PC : phosphatidylcholine ; PE : phosphatidyléthanolamine ; PI : phosphatidylinositol ; PA : acide phosphatidique ; PS : phosphatidylsérine ; AGS : acides gras saturés ; AGMI : acides gras monoinsaturés ; AGPI : acides gras polyinsaturés.

I.3 AUTRES PRODUITS

Les différents solvants et produits utilisés sont répertoriés dans le tableau 2.4.

Tableau 2.4 : Provenance et grade des différents solvants et produits utilisés.

| Solvants et produits | Pureté du produit | Fournisseur |
|--------------------------------|------------------------------|----------------------------|
| Acétone | Purissimum grade pur | Xilab, France |
| Acide acétique glacial | 99% ACS , ISO, RPA | Xilab, France |
| BF₃-Méthanol | 14% dans méthanol | Sigma Aldrich, France |
| Chloroforme | Stabilisé avec 0,75% ethanol | JT Braker, France |
| CO₂ | Pureté 99,5% | Air Liquide, France |
| Ethanol | 96% purissimum grade pur | Xilab, France |
| | Absolu purissimum grade pur | Xilab, France |
| Ether diéthylique | Pureté de 99% | Sigma Aldrich, France |
| Hexane | 96% Qualité technique | Xilab, France |
| Méthanol | 99% purissimum grade pur | Xilab, France |
| Cholestérol | Pureté ≥ 99% | Sigma Aldrich, France |
| DMG | 90% < MG < 95% | Palsgaard, France |
| BHT | Pureté ≥ 99% | Sigma Aldrich, France |
| EDTA | Pureté ≥ 99% | Fischer, France |
| Standard FAME | Mélange C4-C24 | Supelco, France |
| TPP | Pureté ≥ 99% | Sigma Aldrich, France |
| Solvants pour la MS | | |
| Acide acétique | LC-MS grade | Sigma Aldrich, France |
| Chloroforme | HPLC grade | VWR International, France |
| Eau | ULC-MS grade | Biosolve Chemicals, France |
| Isopropanol | ULC-MS grade | Biosolve Chemicals, France |
| Méthanol | LC-MS grade | VWR International, France |
| Triéthylamine | Pureté 99,5% | Sigma Aldrich, France |
| n-Heptane | HPLC grade | VWR International, France |
| Isooctane | HPLC grade | VWR International, France |
| Ethylacétate | HPLC grade | VWR International, France |
| Solvants pour la RMN | | |
| Chloroforme deutéré | Pureté de 99,8% | Eurisotop, France |
| Eau deutérée | | Eurisotop, France |
| Méthanol deutéré | Pureté de 99,8% | Eurisotop, France |

BF₃ : trifluorure de bore ; MS : spectrométrie de masse ; CO₂ : dioxyde de carbone ; LC-MS : chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse ; HPLC : chromatographie liquide haute performance ; ULC-MS : chromatographie ultra liquide couplée à la spectrométrie de masse ; RMN : résonance magnétique nucléaire ; MAG : monoacylglycérol ; BHT : hydroxytoluène butylé ; EDTA : éthylène diamine tétra-acétique ; FAME : esters méthyliques d'acides gras ; TPP : triphénylphosphate.

II. Extraction par fluide supercritique

II.1 DISPOSITIF EXPERIMENTAL

II.1.1 Description du montage

Les extractions par fluide supercritique sont réalisées à partir d'un dispositif assemblé au laboratoire (Figure 2.3). Le CO₂ est, dans un premier temps liquéfié, par un bain thermostaté à -0,3°C (Julabo F12, France) puis pompé à l'aide d'une pompe de type HPLC (Gilson, modèle 305 tête de pompe de 25 SC) associée à un module d'amortissement (Gilson modèle 806). Le co-solvant est, quant à lui, acheminé par un système équivalent (Gilson, pompe modèle 305 tête de pompe de 10 SC, module d'amortissement modèle 805). Un clapet anti-retour et une vanne de purge sont installés sur la ligne du co-solvant. Le CO₂ avec ou sans co-solvant est ensuite chauffé avant son entrée au pied de réacteur. Deux réacteurs tubulaires en inox de capacité 100 mL (3 cm de diamètre et 14 cm de hauteur) ou 490 mL (5 cm de diamètre et 25 cm de hauteur) (Top Industrie, France) sont utilisés. La température du réacteur est régulée par un manteau électrique (Watlow, France). Le réacteur est équipé en pied d'un fritté métallique qui permet une meilleure dispersion du CO₂ sur la section du réacteur. En tête du réacteur, sont placés un disque filtrant de type filtre à café et une grille métallique empêchant l'entraînement de particules solides dans le circuit. Une vanne de laminage précédée par une vanne d'arrêt en sortie de l'enceinte permet de réguler la pression. Deux capteurs de pression à membrane (HD 9408T, TCSA France) sont respectivement placés en sortie du réacteur (pression réacteur) et sur la ligne de sortie (pression sortie). Deux thermocouples de type K (précision 1°C, Watlow, France) sont placés sur la ligne d'alimentation du réacteur et au sein du réacteur par une sortie au niveau de la tête. La ligne de sortie est chauffée à l'aide d'un ruban chauffant pour éviter la formation de carboglace lors de la dépressurisation. En sortie de vanne, le flux est dirigé vers un cyclone en verre dans lequel s'effectue la collecte de l'extrait à pression et température contrôlées. Le CO₂ est évacué vers une hotte aspirante alors que l'extrait est collecté en pied du cyclone dans un tube gradué ou dans un ballon plongé dans de la glace.

Le débit de CO₂ est mesuré en début d'expérience à l'aide d'un compteur à gaz (Actaris G4 Gallus 2000, France) placé après la vanne de laminage et le séparateur cyclonique. Le débit massique du CO₂ est calculé par la relation suivante :

$$F_{\text{CO}_2}^{\text{mass}} = M_{\text{CO}_2} \times \frac{F_{\text{CO}_2}^{\text{gazeux}}}{V_{\text{mol CO}_2}}$$

où $F_{\text{CO}_2}^{\text{gazeux}}$ est le débit volumique mesuré par le compteur à gaz (dm³.min⁻¹)

$V_{\text{mol CO}_2}$ est le volume gazeux d'une mole de CO₂ (22,4 L.mol⁻¹)

$M_{\text{CO}_2} = 44 \text{ g.mol}^{-1}$

Le flux d'éthanol est contrôlé par un suivi dans le temps du volume prélevé par la pompe (éprouvette graduée, 100 ± 0,5 ou 250 ± 2 mL).

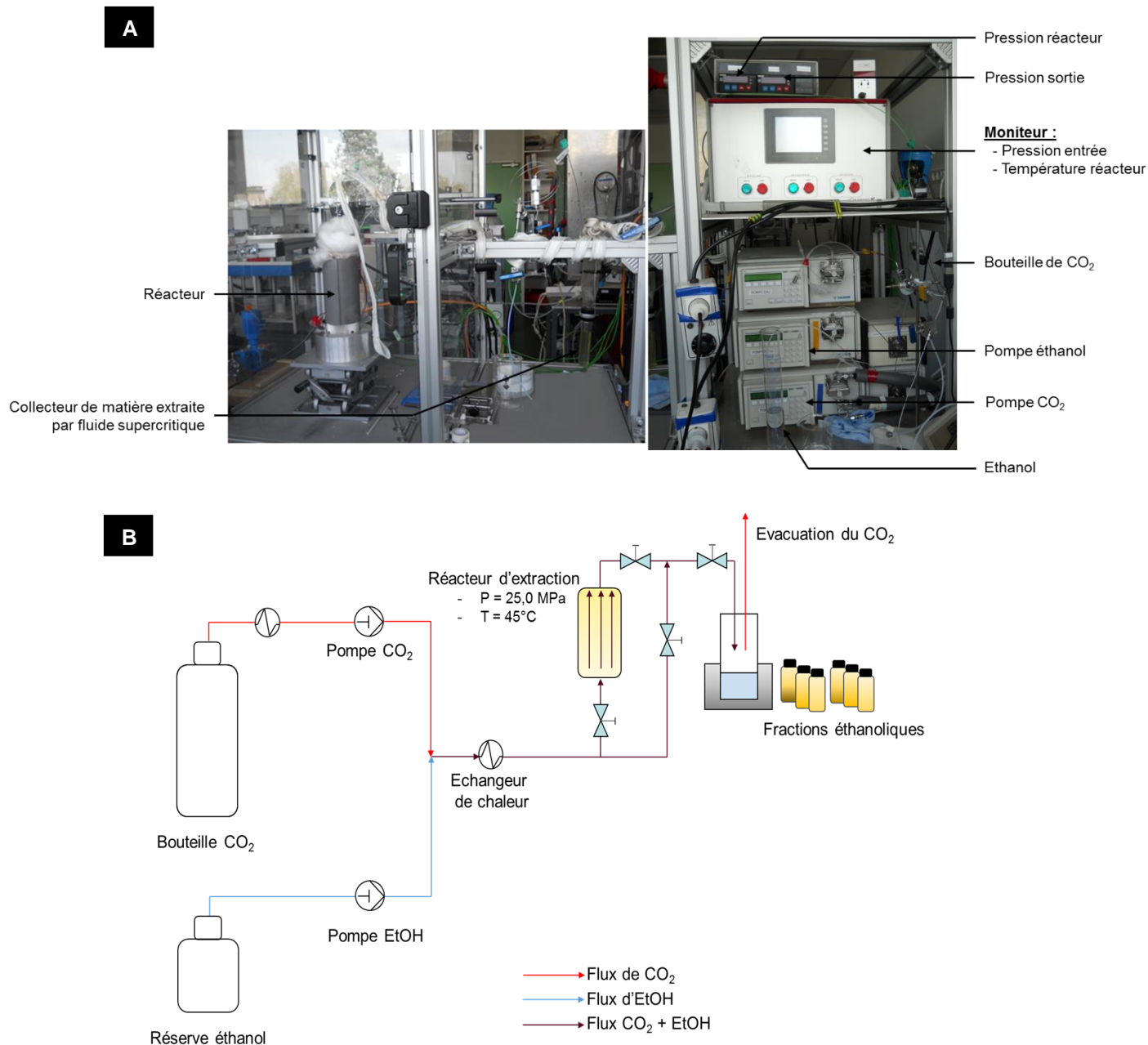


Figure 2.3 : Montage expérimental (A) et schéma (B) de l'extraction par fluide supercritique.

II.1.2 Préparation des échantillons

Avant introduction dans le réacteur, la matière est broyée à l'aide d'un moulin à café (Grinder, Moulinex, France) à l'air ambiant, afin de casser les écailles des tourteaux ou les blocs congelés des sous-produits de la coquille Saint Jacques. Trois à quatre séquences de broyage d'une dizaine de secondes sont réalisées, puis une mesure de la granulométrie est effectuée par tamissage.

Pour les sous-produits de la coquille Saint Jacques, le diamètre moyen des particules est de $125 \pm 40 \mu\text{m}$, tandis que pour les tourteaux Bioplanète, le diamètre moyen est de $295 \pm 66 \mu\text{m}$. Pour les extractions à partir du tourteau de cameline Iterg, la taille des particules est inférieure à $500 \mu\text{m}$. Ce changement dans le protocole permet de gagner du temps au moment de la récupération du résidu lors de sa séparation des billes.

II.1.2 Remplissage du réacteur

Le remplissage du réacteur se fait du pied vers la tête, en alternant des couches de matière première et de billes de 2 mm de diamètre, pour éviter un compactage de la matière (« caking »). Selon la masse chargée ou le volume du réacteur, le lit alterné ne remplit pas la totalité du volume du réacteur. Un lit de billes de hauteur variable en pied et de 1 à 2 cm en tête permet de remplir totalement le réacteur.

Dans le réacteur de 100 mL, le remplissage se compose de la séquence suivante : 1 cm de billes de verre, cinq couches de 2 cm de matière avec 0,5 cm de billes et 1 cm de billes en tête de réacteur. La masse introduite dans le réacteur varie selon la matrice : 30 à 35 g pour la coquille Saint Jacques et 50 à 55 g pour le tourteau de cameline.

Dans le réacteur de 490 mL, le remplissage se compose de la séquence suivante : une dizaine de centimètres de billes, trois couches de 1,5 cm de matière et 2 cm de billes et, enfin, 2 cm de billes en tête de réacteur. Selon la matrice, la quantité introduite dans le réacteur est différente : 60 ou 120 g pour la cameline et 30 ou 60 g pour la coquille Saint Jacques.

II.2 PROTOCOLES ET CONDITIONS OPERATOIRES

Compte-tenu de la durée d'une extraction, la matière broyée est introduite dans le réacteur la veille de l'expérimentation. Afin de prévenir les risques éventuels de dégradation des lipides par oxydation, le réacteur est rempli de CO_2 et maintenu sous pression à 1,2 MPa pendant la nuit. Le lendemain, l'extraction est effectuée selon les étapes suivantes :

- Mise en température du système (jusqu'à 45°C) ;
- Mise en pression du réacteur avec du CO_2 pur jusqu'à 25 MPa ;
- Isolement du réacteur pendant une trentaine de minutes : période statique ;
- Stabilisation du flux de CO_2 via le by-pass et mesure du débit à l'aide du compteur à gaz ;
- Démarrage de la pompe amenant le co-solvant et stabilisation du flux CO_2 avec ou sans éthanol selon l'expérience ;
- Mise en circuit du réacteur et début de l'extraction ;
- Collecte des effluents sous forme de fractions notées F_i où $i=0$ à 7 (au maximum) à des temps réguliers ;

- Arrêt de la pompe du co-solvant et flux de CO₂ pur pendant environ une heure afin d'éliminer l'éthanol de la charge ;
- Dépressurisation du réacteur.

Les conditions de température et de pression d'extraction sont toujours fixées à 45°C et 25 MPa, respectivement.

Deux protocoles d'extraction sont mis en œuvre :

- Protocoles à composition CO₂-éthanol fixe : sur toute la durée de l'extraction, un même pourcentage massique d'éthanol est appliqué. Des extractions sont réalisées à différentes teneurs en éthanol, de façon à identifier la teneur minimale d'éthanol permettant l'extraction des phospholipides avec le meilleur rendement.
- Protocole avec gradient d'éthanol : pendant l'extraction, la composition du fluide en éthanol varie, en imposant d'abord 7%mass d'éthanol, puis 27%mass. Le pourcentage est modifié en jouant sur le débit d'éthanol. L'objectif de ce gradient est d'améliorer la pureté de la fraction en phospholipides, c'est à dire d'appauvrir la fraction en lipides neutres (Montanari et al., 1996 ; Tanaka et al., 2004).

D'autres paramètres sont étudiés ponctuellement, tels que la teneur en eau de la matière première et de l'éthanol, l'influence d'un lit simple comparé à un lit alterné (réalisés sur la cameline et avec le réacteur de 100 mL). L'ordre de grandeur des débits de CO₂ est également notifié. Dans le réacteur de grande capacité (490 mL), le débit de CO₂ est augmenté de façon à maintenir un nombre de Reynolds du même ordre de grandeur que celui du réacteur de 100 mL afin de maintenir le même écoulement (Annexe 1). Le tableau 2.5 récapitule l'ensemble des essais réalisés.

Tableau 2.5 : Protocoles d'extraction appliqués selon la matrice étudiée et nombre de fractions récoltées.

| Matrice | Fournisseur | Réacteur (mL) | Ethanol | %mass éthanol | Masse chargée (g) | Débit CO ₂ (g.min ⁻¹) | Nombre d'extraction réalisée | Nombre de fractions analysées |
|--|------------------|---------------|----------------------------|---------------------|-------------------|--|------------------------------|-------------------------------|
| Cameline | Bioplanète | 100 | Composition fixe d'éthanol | 0 / 2 / 7 / 15 / 27 | 56,8 ± 2,8 | 6,3 ± 0,5 | 10 | 56 |
| | | 100 | Gradient d'éthanol | 7-27 | 55,0 | | | |
| | | 490 | Gradient d'éthanol | 7-27 | | 6,5 | 1 | 7 |
| | | | | | 60,0 et 119,9 | 11,8 à 12,3 | 2 | 15 |
| Cameline | Iterg | 100 | Gradient d'éthanol | 7-27 | 48,9 ± 13,0 | 6,7 ± 0,5 | 7 | 50 |
| | | 490 | Gradient d'éthanol | 7-27 | 120,1 | 12,8 | 1 | 8 |
| Lin | Bioplanète | 490 | Composition fixe d'éthanol | 27 | 35,22 | 15,4 | 1 | 8 |
| | | 490 | Gradient d'éthanol | 7-27 | 35,0 ± 0,6 | 15,5 ± 0,6 | 3 | 21 |
| Sésame | Bioplanète | 490 | Composition fixe d'éthanol | 26 | 35,0 | 15,0 ± 0,5 | 2 | 14 |
| | | 490 | Gradient d'éthanol | 7-26 | 35,0 | 14,7 | 1 | 7 |
| Sous-produits de la coquille Saint Jacques | Poissonier local | 100 | Composition fixe d'éthanol | 7 / 15 / 30 | 35,2 ± 1,5 | 6,3 ± 0,5 | 5 | 31 |
| | | 100 | Gradient d'éthanol | | | | | |
| | | 490 | Composition fixe d'éthanol | 7-27 | 32,8 | 7,4 | 1 | 7 |
| | | 490 | Gradient d'éthanol | 30 | 30,0 | 14,9 | 1 | 9 |
| | | | | 7-30 | 30,0 et 60,0 | 13,6 ± 0,5 | 6 | 45 |

II.3 CARACTERISATION DES EXTRACTIONS

L'extraction conduit à l'obtention de plusieurs fractions collectées au cours du temps et analysées en termes de :

- **Masse de matière extraite dans la fraction ($m_{\text{extraite fraction}}$)** : déterminée pour chacune des fractions obtenues (§ III.2). Cette masse permet de construire une courbe de cinétique d'extraction exprimée en masse cumulée de matière extraite dans les fractions en fonction de la masse de fluide utilisée ($\sum m_{\text{extraite } Fi} = f(\sum m_{\text{flu util}})$).
- **Masse totale extraite ($m_{\text{tot extraite}}$)** : somme de l'ensemble des masses extraites lors de l'extraction (§ III.2.2).
- **Masse totale chargée ($m_{\text{tot chargée}}$)** : masse de la matrice introduite dans le réacteur.
- **Masse totale de lipides totaux (LT) dans la fraction (m_{LT})** : masse de LT quantifiée dans la fraction.
- **Masse totale de lipides totaux extraits ($m_{LT \text{ extraits}}$)** : correspond à la différence entre la masse de LT présents dans la charge et la masse de LT présents dans le résidu (§ III.2.1) (matière récupérée dans le réacteur après extraction par fluide supercritique). La masse du résidu doit être connue.
- **Masse de lipides totaux chargés ($m_{LT \text{ chargés}}$)** : définie à partir de la masse moyenne de LT contenue dans 100 g de matière (§ III.2.1)
- **Masse de phospholipides extraits dans la fraction ($m_{PL \text{ extraits fractions}}$)** : masse de phospholipides déterminée par Résonance Magnétique Nucléaire du phosphore (RMN ^{31}P , § III.4.2.2) présente dans la fraction analysée.
- **Masse de phospholipides chargés ($m_{PL \text{ chargés}}$)** : définie à partir de la masse moyenne de PL contenus dans 100 g de matière (§ III.4.2.2).
- **Masse totale de phospholipides extraits ($m_{\text{tot PL extraits}}$)** : correspond à la différence entre la masse de PL présents dans la charge et la masse de PL présents dans le résidu déterminée par RMN ^{31}P (§ III.4.2.2).

Ces données permettent le calcul des rendements d'extraction et de pureté des fractions (Tableau 2.6).

Tableau 2.6 : Calculs de rendement et de pureté caractérisant les différentes extractions.

| Terme | Formule |
|---|--|
| Rendement global (%) | $\eta_{\text{global}} = \frac{m_{\text{tot extraites}}}{m_{\text{tot chargées}}} \times 100$ |
| Rendement d'extraction des lipides (%) | $\eta_{\text{LT}} = \frac{m_{\text{tot LT extraits}}}{m_{\text{LT chargés}}} \times 100$ |
| Rendement d'extraction des phospholipides (%) | $\eta_{\text{PL}} = \frac{m_{\text{tot PL extraits}}}{m_{\text{PL chargés}}} \times 100$ |
| Pureté en LT de la fraction (%) | $\frac{m_{\text{LT}}}{m_{\text{extraite fraction}}} \times 100$ |
| Pureté en PL de la fraction (%) | $\frac{m_{\text{PL extraits fraction}}}{m_{\text{extraite fraction}}} \times 100$ |

LT : lipides totaux ; PL : phospholipides ; tot : totale.

Par ailleurs, la composition en acides gras des lipides totaux des matrices et des PL présents dans les fractions est déterminée selon le protocole décrit dans le § III.5.2. Les classes et/ou espèces de PL présents dans les lipides totaux des matrices ou de certaines fractions sont identifiées par RMN ^{31}P (§ III.4.2.2) et spectrométrie de masse (§ III.4.3) dans le but d'utiliser ces fractions pour la formulation de liposomes/éthosomes (§ IV). Enfin, un bilan matière en éthanol est réalisé par comparaison entre le volume d'éthanol injecté dans le système et le volume d'éthanol récupéré dans les fractions.

III. Caractérisation des matrices et des extraits supercritiques

III.1 TENEUR EN EAU DES MATRICES

La teneur en eau des différentes matrices est mesurée à l'aide d'une balance infrarouge (Sartorius MA 150C, France). Les matrices sont chauffées à une température de 105°C. La mesure de la masse est réalisée lorsqu'il y a stabilisation de la masse de l'échantillon sur une durée de 45 secondes. La teneur en eau est donnée par la différence entre la masse introduite et la masse obtenue après chauffage.

III.2 TENEUR EN LIPIDES TOTAUX DES MATRICES, DES RESIDUS ET DES FRACTIONS ISSUES DES EXTRACTIONS PAR FLUIDE SUPERCRITIQUE

III.2.1 Extraction des lipides totaux par la méthode de Folch

Les lipides totaux contenus dans les matrices initiales (tourteaux végétaux et coquille Saint Jacques), dans les résidus ou dans les fractions issues des extractions de la coquille Saint Jacques sont extraits selon la méthode de Folch (Folch et al., 1957) en utilisant un mélange chloroforme

(CHCl₃)/méthanol (MeOH) (2/1 ; v/v) à raison de 20 volumes par masse de matériel. Avant l'extraction, les tourteaux d'oléagineux et sous-produits de la coquille Saint Jacques (après conditionnement) sont broyés via un homogénéiseur (Ultra-Turrax® VDI 25, VWR, France) en présence d'un antioxydant (BHT à 0,01% dans le chloroforme). Au terme d'une heure d'agitation, 0,2 volume d'une solution de chlorure de potassium (KCl, 0,8% dans l'eau) par volume du mélange d'extraction est ajouté pour permettre la séparation des phases hydroalcoolique et chloroformique. Le mélange est mis sous agitation pendant 10 minutes avant d'être centrifugé (560 g, Jouan GT4i, ThermoFisher Scientific, France). La phase chloroformique est récupérée et lavée trois fois par un mélange de solvants (MeOH/KCl/CHCl₃ ; 48/47/3 ; v/v/v) d'un volume équivalent à la phase hydroalcoolique précédente. Après trois lavages, la phase chloroformique est « éclaircie » par ajout de méthanol puis filtrée sur papier pasteur (diamètre des pores : 5-13 µm, diamètre du filtre : 150 mm, VWR) en utilisant un mélange CHCl₃/MeOH (2/1 ; v/v). Le filtrat est séché en utilisant un évaporateur rotatif afin d'éliminer toute trace d'eau, mis en solution dans du chloroforme et filtré une seconde fois sur un filtre Whatman (diamètre des pores : 1,6 µm, diamètre du filtre : 70 mm). Le chloroforme est évaporé sous un courant d'azote afin de calculer la quantité de lipides dans l'échantillon. L'extrait sec est remis en solution dans du chloroforme et conservé à -20°C.

Le taux de lipides totaux (LT) est déterminé par la relation :

$$\% \text{ LT} = \frac{\text{masse de lipides extraits}}{\text{masse initiale d'échantillon}} \times 100$$

III.2.2 Evaluation de la teneur en lipides totaux dans les fractions extraites de tourteaux végétaux

Les fractions obtenues suite à l'extraction des tourteaux végétaux peuvent être soit biphasiques, soit essentiellement éthanoliques (Figure 2.4).

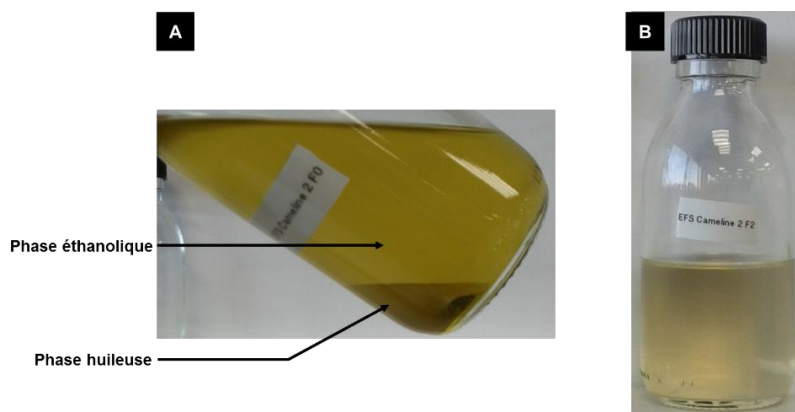


Figure 2.4 : Types de fractions collectées au cours de l'extraction à partir de tourteaux végétaux. A : fraction biphasique avec une phase plus dense (phase huileuse) et une phase éthanolique (EFS Cameline 2 F0) ; B : fraction constituée essentiellement de solution éthanolique (EFS Cameline 2 F2).

Les fractions contenant une phase huileuse (Figure 2.4.A) sont d'abord centrifugées (875 g, Jouan GT4i, ThermoFisher Scientific, France) puis le surnageant (phase éthanolique) est prélevé. Quatre mL de cette phase sont évaporés sous flux d'azote jusqu'à l'obtention d'une matière dépourvue d'éthanol, qui est ensuite pesée ($m_{\text{sans EtOH}}$). Connaissant le volume du surnageant ($V_{\text{tot fraction}}$), la masse extraite présente dans l'éthanol est calculée. La phase huileuse est également mise sous flux d'azote afin d'éliminer l'éthanol qu'elle pourrait contenir. Le poids de cette phase est assimilé à la masse de lipides totaux (m_{LT}). La masse totale de la fraction correspond à la somme des masses issues de la phase éthanolique et de la phase huileuse :

$$m_{\text{extraite fraction}} = m_{\text{LT}} + \frac{m_{\text{sans EtOH}}}{4} \times V_{\text{tot fraction}}$$

Ainsi la pureté en LT des fractions (%) peut être déterminée (cf § II.3).

Pour les fractions ne contenant pas de phase huileuse distincte à l'œil nu (Figure 2.3.B), 4 mL de la fraction sont évaporés, puis la matière sans éthanol est pesée. La masse de la matière extraite dans la fraction est déterminée selon la formule :

$$m_{\text{extraite fraction}} = \frac{m_{\text{sans éthanol}}}{4} \times V_{\text{tot fraction}}$$

III.3 SEPARATION ET PURIFICATION DES FRACTIONS LIPIDIQUES PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

III.3.1 Séparation des lipides par chromatographie sur couche mince

Différents échantillons (LT ou préparations d'esters méthyliques) sont séparés par chromatographie sur couche mince (CCM). Des plaques en verre de 20x10 cm ou 10x5 cm recouvertes d'un film Silicagel 60 F₂₅₄ (Merck, France) sont utilisées. Les mélanges de solvants sont adaptés selon les espèces de lipides à séparer (Tableau 2.7).

Tableau 2.7 : Composition des solvants de migration utilisés.

| Solvants | Mélange solvants (vol) | Espèces lipidiques séparées |
|---|------------------------|---|
| Ether diéthylique / acétone | 60/20 | Lipides polaires / lipides apolaires |
| Hexane / éther diéthylique / acide acétique | 90/10/1 | Différents lipides apolaires |
| Hexane / éther diéthylique / acide acétique | 80/20/1 | Purification des esters méthyliques d'acides gras |
| Chloroforme / méthanol / acide acétique | 32/12,5/5,5 | Classes de phospholipides individuels |

Les différentes espèces lipidiques sont visualisées sous lampe UV à 254 nm. Les zones fluorescentes correspondant aux différentes fractions lipidiques sont identifiées par comparaison avec

les rapports de front des standards lipidiques (cholestérol, MAG et Lecisoya P97) chromatographiés dans les mêmes conditions.

III.3.2 Extraction des phospholipides du gel de silice

Les PL et les lipides neutres sont séparés par CCM en utilisant un mélange éther diéthylique/acétone (60/20, v/v) (Wolff et al., 1985). Après séparation des classes de lipides, les phospholipides, restés au niveau du dépôt, sont extraits du gel de silice par deux lavages avec un mélange chloroforme/méthanol (2:1, v/v), puis un lavage avec du méthanol. Les phases organiques sont regroupées et évaporées sous un flux d'azote. Les extraits secs sont ensuite repris par 2 mL du mélange chloroforme/méthanol (2/1 ; v/v) et 0,4 mL d'une solution de KCl (0,8%). Après avoir séparé la phase aqueuse de celle du chloroforme, le mélange MeOH/KCl/CHCl₃ (48/47/3 ; v/v/v) est ajouté sur la phase chloroformique en vue d'éliminer l'indicateur fluorescent initialement présent dans la silice. La phase chloroformique finale contenant les phospholipides est séchée sous azote, reprise dans du chloroforme et stockée à -20°C sous azote.

III.4 CARACTERISATION DES PHOSPHOLIPIDES DES MATRICES ET DES FRACTIONS ISSUES DES EXTRACTIONS PAR FLUIDE SUPERCRITIQUE

III.4.1 Dosage colorimétrique du phosphore

Les phospholipides, séparés des autres lipides par CCM, sont quantifiés par un dosage colorimétrique du phosphore selon la méthode de Ames (Ames, 1966). Après avoir récupéré le spot de silice correspondant aux phospholipides, 200 µL d'eau bidistillée et 120 µL de nitrate de magnésium en solution dans l'éthanol (10% ; mass/v) sont ajoutés pour une minéralisation à la flamme. Afin de décomposer les pyrophosphates éventuellement formés lors de la minéralisation, 300 µL d'acide chlorhydrique (0,5 N) sont ajoutés. Les tubes sont ensuite placés dans un bain d'huile à 100°C pendant 15 minutes. Après refroidissement, la coloration est obtenue par addition de 700 µL d'un mélange (1/6 ; v/v) d'acide ascorbique (10% dans l'eau ; mass/v) / molybdate d'aluminium (3,4 mM dans l'acide sulfurique 1 N). Les échantillons sont placés au bain marie dont la température est fixée à 45°C. Après 20 minutes, la densité optique (DO) est lue au spectrophotomètre (Secomam Anthélie, France), à une longueur d'onde de 820 nm, contre un blanc ayant subi le même protocole mais sans présence de phospholipides. Un blanc contenant uniquement du gel de silice subit aussi le même traitement.

La quantité de PL est déterminée à partir d'une gamme étalon d'une solution de phosphate de potassium (1 mM) minéralisée et dosée dans les mêmes conditions que les échantillons. A partir de cette gamme, une courbe de référence est réalisée, ce qui permet de calculer le nombre de nano-atomes de phosphore dans l'échantillon. Le nombre de moles de phospholipides contenu dans les échantillons est obtenu en supposant un atome de phosphore par molécule de phospholipide et en considérant une masse molaire moyenne de 775 g.mol⁻¹ pour les phospholipides.

Le taux de phospholipides par rapport aux lipides totaux est donné par :

$$\tau = \frac{A_{\text{échantillon}} - A_{\text{Si}}}{m_{\text{échantillon}} \times a} \times 775 \times 10^{-3}$$

où $m_{\text{échantillon}}$ = masse de lipides totaux déposée sur la plaque

a = coefficient de la droite de référence

A_{Si} = Absorbance d'un échantillon de silice ayant subi le protocole de minéralisation et dosage

III.4.2 Résonance Magnétique Nucléaire du phosphore 31

La quantification et l'identification des phospholipides à partir des extraits de Folch et des fractions obtenues par extraction supercritique sont réalisées par RMN ^{31}P .

III.4.2.1 Principe de la RMN

La spectroscopie RMN consiste à observer les transitions entre des niveaux d'énergie très proches d'un noyau, possédant un spin nucléaire non nul, et soumis à un champ magnétique (B_0). Dans le cas du ^{31}P et du ^1H possédant un spin nucléaire 1/2, deux états de spin sont possibles et donc deux moments magnétiques existent (^{31}P et ^1H , spins : $s = \frac{1}{2}$ ou $-\frac{1}{2}$). Lorsqu'un champ magnétique B_0 est appliqué, les noyaux s'alignent sur le champ mais entrent dans le même temps en précession (mouvement de rotation sur lui-même) à une certaine fréquence dite de Larmor ν_0 (Figure 2.4) :

$$\nu_0 = \frac{\gamma B_0}{2\pi}$$

où γ : rapport gyromagnétique, caractéristique de chaque noyau.

L'aimantation résultante le long de l'axe z (colinéaire à B_0) est notée M_0 (moment magnétique).

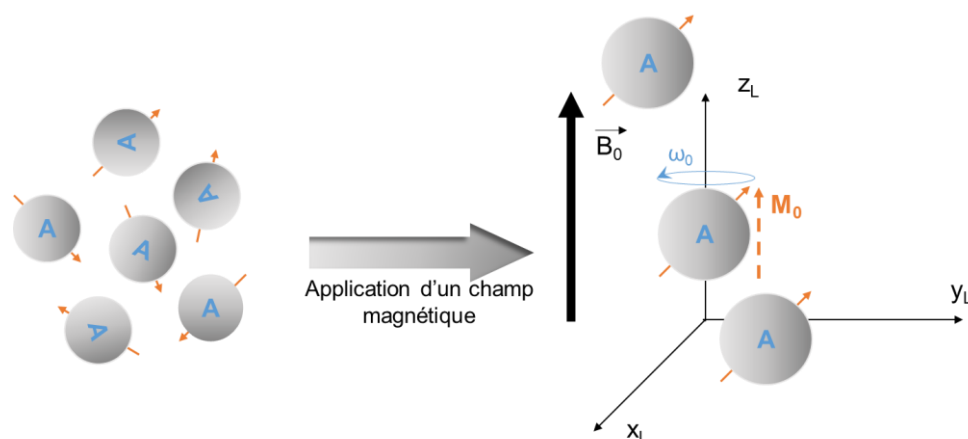


Figure 2.5 : Application d'un champ magnétique B_0 .
 A : Atome ; M_0 : moment magnétique ; ω_0 = vitesse angulaire.

Pour qu'il y ait basculement du moment magnétique, il faut appliquer un champ B_1 perpendiculaire à B_0 et qui oscille à la fréquence de Larmor. Le champ B_1 perturbe la distribution des spins de sorte que M_0 bascule le long de l'axe y' (Figure 2.5).

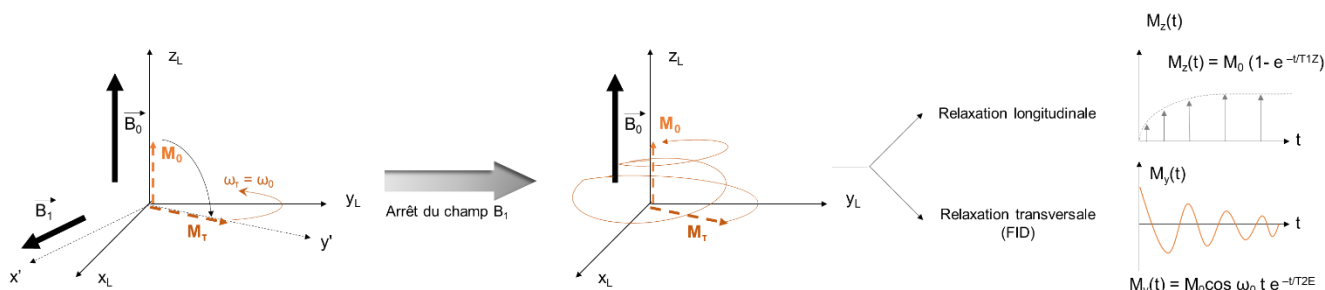


Figure 2.6 : Perturbation et relaxation du moment magnétique.

Lors de l'arrêt du champ B_1 , le signal RMN appelé aussi Free Induction Decay est enregistré alors que le système retourne à l'équilibre initial. On parle de relaxation (Figure 2.6). Cette dernière se décompose en deux parties : une relaxation longitudinale selon l'axe z (caractérisée par un temps T_{1z}) et une relaxation transversale (caractérisée par un temps T_2) selon le plan xy . L'évolution de la première relaxation par rapport à l'axe des z est de type exponentiel, la seconde est sinusoïdale amortie par rapport à l'axe des y . Le passage du signal RMN du domaine temporel au domaine fréquentiel est assuré par la transformée de Fourier. Cela conduit à l'obtention d'un spectre composé de raies dont la position en fréquence, appelée déplacement chimique, est liée à l'environnement électronique du noyau et dont la largeur dépend notamment de la dynamique des molécules.

III.4.2.2 Quantification et identification des phospholipides

L'identification des phospholipides est déterminée par le déplacement chimique spécifique de leur noyau phosphore entre -1 ppm et 2 ppm. La quantification est réalisée sur un spectromètre RMN Bruker Avance 400 (Bruker biospin, France) équipé d'une sonde 5 mm QNP ^1H - $^{13}\text{C}/^{31}\text{P}/^{19}\text{F}$. Les expériences sont faites avec une régulation en température à $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$, dans des tubes de verre de 5 mm de diamètre, contenant l'échantillon. Après avoir évaporé le chloroforme non deutéré sous un flux d'azote, une masse connue de l'échantillon est solubilisée avec 330 μL de chloroforme deutéré (CDCl_3), 130 μL de méthanol deutéré (MeOD) et 50 μL de solution de triphénylphosphate (TPP, étalon interne) de concentration connue et préparée dans un mélange $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ (7/1 ; v/v). Enfin, 30 μL d'une solution aqueuse d'EDTA (0,2 M, pH=6) sont ajoutés à l'échantillon. L'addition d'EDTA permet une meilleure résolution des pics, vraisemblablement par écrantage des charges des PL (Annexe 2 ; spectre RMN ^{31}P avec et sans EDTA).

La séquence d'impulsion appliquée est une impulsion simple de 90° avec un découplage des protons pendant l'acquisition et une fréquence de résonance de 62 MHz. La fenêtre spectrale utilisée est de 50 kHz, un nombre de scans variant de 10 à 40 k selon les échantillons, un nombre de points de données de 32 K, une largeur d'impulsion de $\pi/2$ et un temps de recyclage de 15 μs . Le traitement

des données est réalisé à l'aide du logiciel Topsin 1.3. Un filtrage numérique 5 Hz est appliqué avant la transformée de Fourier.

L'intégration des pics de l'ensemble des phospholipides (d'intensité proportionnelle à la quantité de phosphore) est rapportée au pic de la référence interne (TPP). En plus de servir d'étalon interne, le TPP est aussi utilisé pour la calibration de l'axe des abscisses ($\delta = -17,95$ ppm) (Kaffarnik et al., 2013). La quantité de phospholipides est calculée à partir du nombre de mole de TPP (n_{TPP}) :

$$n_{\text{TPP}} = \frac{[\text{TPP}] \times V_{\text{TPP}}}{M_{\text{TPP}}}$$

où M_{TPP} : 326,28 g.mol⁻¹

V_{TPP} : volume de TPP (50 μL)

$[\text{TPP}]$: concentration massique connue de TPP

La molécule de TPP contient un atome de phosphore. Ainsi $n_{\text{TPP}} = n_{\text{P}}$ (mole de phosphore) et le nombre de mole de phospholipides (n_{PL}) est donné par :

$$n_{\text{PL}} = I_{\text{PL}} \times n_{\text{P}}$$

où I_{PL} correspond à l'intégrale des pics des phospholipides déterminée par RMN ³¹P.

La masse de phospholipides (m_{PL}) dans l'échantillon est donc donnée par :

$$m_{\text{PL}} = M_{\text{PL}} \times n_{\text{PL}}$$

où $M_{\text{PL}} = 775$ g.mol⁻¹ masse molaire moyenne des phospholipides

Pour l'identification et la quantification relative des classes de PL, une étape de déconvolution est effectuée à l'aide du logiciel DmFit (Massiot et al., 2002). L'attribution des pics se fait selon les données de la littérature (Tableau 2.8).

Tableau 2.8 : Déplacement chimique de différentes classes de phospholipides par RMN ³¹P.

| Classe de phospholipides | Déplacement chimique (ppm) | | | |
|--------------------------|--|-----------------------------------|--|----------------------|
| | Mélange de PL commerciaux ^a (Estrada et al., 2008) | Mélange de standards ^b | Poisson ^c (Kaffarnik et al., 2013) | Fromage ^c |
| PC | -0,84 | -0,84 | -0,865 | -0,839 |
| PCp ^d | -0,840 | - | - | - |
| PI | -0,384 | -0,363 | -0,398 | -0,358 |
| LPC | -0,291 | -0,277 | -0,294 | -0,281 |
| LPCp ^d | - | -0,204 | -0,232 | - |
| SM | -0,090 | -0,066 | -0,089 | -0,067 |
| PS | -0,148 | - | - | - |
| PE | 0,018 | 0,037 | - | 0,026 |
| PEp ^d | 0,058 | - | - | - |
| LPE | 0,464 | 0,462 | 0,447 | 0,463 |
| LPEp ^d | 0,556 | - | - | - |
| DHSM | 0,117 | 0,142 | - | 0,128 |
| PA | 0,180 | 0,230 | 0,202 | 0,246 |
| PAp ^d | 0,223 | - | - | - |
| PG | 0,465 | 0,475 | 0,432 | 0,469 |
| LPA | 0,821 | 0,843 | 0,811 | 0,870 |
| LPG | 0,947 | - | - | - |
| CL | 0,168 | - | 0,135 | 0,194 |

^a Calibration effectuée par rapport à la sphingomyéline (SM) : $\delta = -0,090\text{ppm}$

^b Calibration effectuée par rapport à la phosphatidylcholine : $\delta = -0,84\text{ppm}$

^c Calibration effectuée par rapport au TPP : $\delta = -17,95\text{ppm}$

^d p = plasmalogène

PC : phosphatidylcholine ; PI : phosphatidylinositol ; LPC lysophosphatidylcholine ; SM : sphingomyéline ; PS : phosphatidylsérine ; PE : phosphatidyléthanolamine ; LPE : lysophosphatidyléthanolamine ; DHSM : dihydrosphingomyéline ; PA : acide phosphatidique ; PG : phosphatidylglycérol ; LPA : acide lysophosphatidique ; LPG lysophosphatidylglycérol ; CL : cardiolipine.

III.4.3 Spectrométrie de masse

III.4.3.1 Principe

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse physico-chimique permettant de détecter, d'identifier et de quantifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse. Elle permet aussi de caractériser la structure chimique des molécules en les fragmentant. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z).

La spectrométrie de masse consiste dans un premier temps à produire en phase gazeuse des ions positifs ou négatifs (ions moléculaires ou précurseurs) de la (ou des) molécule(s) d'intérêt dans la source d'ionisation (ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) ou par électrospray (ESI), par exemple). Les ions obtenus (ions précurseurs) sont balayés dans un premier analyseur, puis détectés suivant le rapport de la masse au nombre de charge. En spectrométrie de masse en tandem (MS/MS), les ions précurseurs vont se fragmenter dans une cellule de collision qui sépare les deux analyseurs.

Lors de l'ionisation, les phospholipides PE, PS, PA, PI et PG se chargent négativement, tandis que la PC se charge positivement. Ensuite, les PL sont fragmentés dans la cellule de collision en trois parties : la tête polaire et les deux chaînes d'acides gras. Les ions ainsi obtenus (ions fils ou ions produits) sont ensuite séparés dans un second analyseur en fonction de leur rapport masse/charge (m/z) (Figure 2.7). Lors de la fragmentation, les acides gras libres forment des ions chargés négativement, qui ne sont observables qu'en mode négatif. Les ions produits fournissent des informations sur la nature et la structure de la molécule et permettent de caractériser cette molécule.

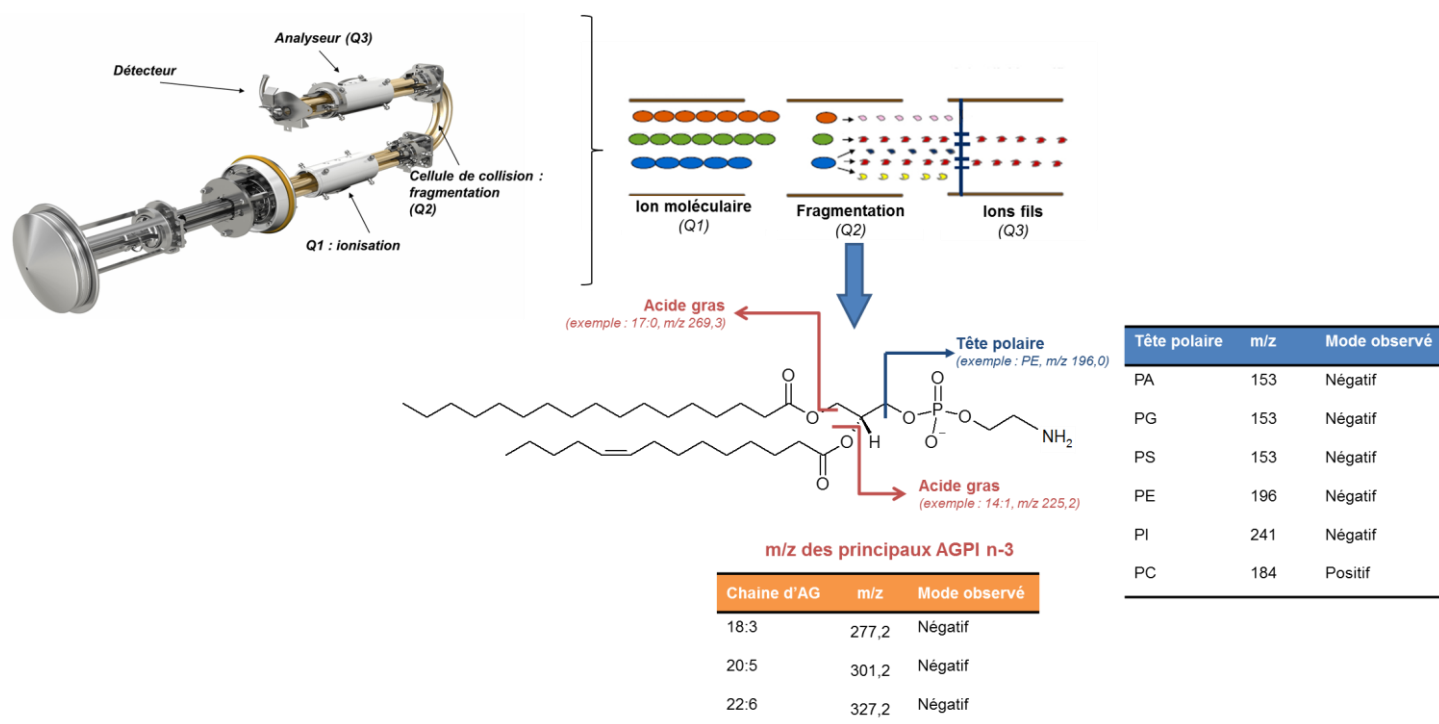


Figure 2.7 : Spectromètre de masse et son principe dans la fragmentation des phospholipides.

AG : acide gras ; AGPI : acide gras polyinsaturé ; PA : acide phosphatidique ; PG : phosphatidylglycérol ; PS : phosphatidylsérine ; PE : phosphatidyléthanoline ; PI : phosphatidylinositol ; PC : phosphatidylcholine.

III.4.3.2 Shotgun

Le shotgun est une méthode d'analyse dans laquelle l'échantillon (extrait de phospholipides) est directement injecté dans le spectromètre de masse (Qtrap 5500, AB Sciex, Canada) après ionisation

par électrospray (Source TurboV). Les phospholipides extraits par CCM sont dilués à une concentration finale de 0,1 mg.mL⁻¹ dans un mélange chloroforme/méthanol (2/1, v/v) contenant 7,5 mM d'acétate d'ammonium et injectés dans la source du spectromètre de masse à un débit de 7 µL.min⁻¹. Le mode d'utilisation appliqué en spectrométrie de masse en tandem (ESI-MS/MS) est le balayage d'ions précurseurs. Ce mode consiste à balayer le premier analyseur en m/z des ions précurseurs et à focaliser le second analyseur sur un ion produit particulier. Ce mode permet ainsi de déterminer l'ensemble des ions précurseurs qui se sont fragmentés pour donner l'ion produit choisi. La même procédure est appliquée à un mélange standard de phospholipides. Les expériences ESI-MS/MS sont réalisées en mode négatif pour visualiser les phospholipides PE, PS, PA, PI et PG à l'aide de 53 scans afin d'identifier les chaînes d'acides gras composées de 14 à 26 atomes de carbones (seulement les nombres pairs d'atomes de carbone + C17 qui est l'acide gras de référence pour l'analyse) et de 0 à 6 insaturations et les ions correspondant aux têtes polaires et en mode positif pour visualiser l'ion issu de la fragmentation de PC correspondant à la tête polaire (1 scan). Les espèces de phospholipides sont identifiées grâce à l'utilisation du logiciel Lipid View (v1.0, AB Sciex, Canada) (Buré et al., 2013). Le shotgun permet d'identifier et de quantifier les têtes polaires avec les chaînes d'acides gras correspondantes.

Cette méthode a été utilisée grâce à une collaboration avec C. Buré (CBMN).

III.4.3.3 Chromatographie liquide en phase inverse couplée à la MS/MS

L'analyse en LC-IP-MS/MS est réalisée avec un Qtrap 5500 (AB Sciex) couplé avec un système de chromatographie liquide (Ultimate 3000, Dionex). Cinq µL d'extraits de lipides totaux sont ajoutés à 5 µL de standards internes (PE 17:0/17:0, PS 17:0/17:0, PC 17:0/17:0, PA 17:0/17:0, PI 17:0/14:1 et PG 17:0/17:0, à une concentration de 10 µM pour chaque PL) et dilués dans 40 µL d'isopropanol/méthanol/eau (50/10/40, v/v/v). Les analyses sont menées en mode négatif ou positif. Le gaz de collision utilisé est l'azote. L'énergie de collision varie de -48 à -62 eV pour les phospholipides suivants : PE, PA, PG, PS et PI. Elle est fixée à 47 eV pour la PC. Les expériences en MS/MS sont réalisées avec 18 scans MRM (Multiple Reaction Monitoring) en mode positif et 247 scans MRM en mode négatif selon l'identification préétablie par la technique du shotgun. Les phospholipides sont quantifiés grâce à l'utilisation du logiciel Multi Quant (v2.1, AB Sciex).

La séparation des phospholipides par chromatographie liquide est menée à 40°C sur une colonne Synergi Fusion-RP, 80 Å, 150x1 mm, 4 µm (Phenomenex, France). Le gradient d'élution est une combinaison d'un éluant A (isopropanol/méthanol/eau (50/10/40 v/v/v) avec 0,2% d'acide formique et 0,028% d'hydroxyde d'ammonium) et d'un éluant B (isopropanol avec 0,2% d'acide formique et 0,028% d'hydroxyde d'ammonium) dont les proportions varient au cours de l'élution (Tableau 2.9). Le flux est de 40 µL.min⁻¹. Trois µL d'échantillon sont injectés.

Tableau 2.9 : Gradient d'élution appliqué en chromatographie liquide.

| Temps d'élution (min) | Eluant A (%) | Eluant B (%) |
|--------------------------|-----------------|-----------------|
| 0 | 70 | 30 |
| 0-5 | 50 | 50 |
| 5-30 | 20 | 80 |
| 30-35 | 70 | 30 |

A = isopropanol/méthanol/eau (50/10/40 v/v/v) avec 0,2% d'acide formique et 0,028% d'hydroxyde d'ammonium ; B = isopropanol avec 0,2% d'acide formique et 0,028% d'hydroxyde d'ammonium.

Pour l'identification des espèces de phospholipides (répartition des acides gras sur le squelette glycérol), la loi d'attribution est la suivante : pour les phospholipides PI, PA et PS, l'intensité du pic attribué à l'anion carboxylate R1COO⁻ sn-1 est supérieure ou égale à l'intensité de celui se trouvant en position sn-2 ; pour PE et PG, l'intensité du pic de l'anion carboxylate en sn-2 a une intensité supérieure à celui localisé en position sn-1. La chromatographie en phase inverse permet une séparation des phospholipides par la chaîne d'acide gras. Elle permet de quantifier les classes de PL et leurs chaînes d'acide gras, excepté pour la phosphatidylcholine pour laquelle on accède uniquement au nombre total de carbone.

Cette méthode a été utilisée grâce à une collaboration avec C. Buré (CBMN).

III.4.3.4 Chromatographie liquide en phase normale couplée à la MS/MS

L'analyse en LC-NP-MS/MS est réalisée sur un système de chromatographie liquide de type RSLC Ultimate-3000, de (Dionex, Thermofisher) couplé à un spectromètre de masse LTQ-Orbitrap Velos Pro (Thermofisher). La séparation des lipides est menée à 35°C sur une colonne PVA-Sil (150 x 2,1 mm I.D, 120 Å) (YMC Europe GmbH) munie d'une pré-colonne de 10 x 2 mm remplie avec la même phase stationnaire, fournie par Interchim (Montluçon, France). La méthode chromatographique est issue de la publication d'Imbert et collaborateurs (2012). Le débit est de 400 µL.min⁻¹ et 5 µL d'échantillon de lipides totaux repris dans du chloroforme sont injectés. Le gradient d'élution est une combinaison d'un éluant A (n-heptane/2-propanol (98:2, v/v)), d'un éluant B (chloroforme/2-propanol (65:35, v/v)) et d'un éluant C (méthanol/eau (95:5, v/v)) (Tableau 2.10). Un % acide acétique et 0,08% triéthylamine (TEA) sont ajoutés dans chaque éluant.

Tableau 2.10 : Gradient d'élution appliqué en chromatographie liquide en phase normale.

| Temps d'élution (min) | Eluant A (%) | Eluant B (%) | Eluant C (%) |
|--------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 0-2 | 98 | 2 | 0 |
| 2-8 | 12 | 88 | 0 |
| 8-26 | 0 | 60 | 40 |

A = n-heptane/2-propanol (98:2, v/v) ; B = chloroforme/2-propanol (65:35, v/v) ; C = méthanol/eau (95:5, v/v).

En sortie de colonne, seuls 150 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ sont dirigés vers le spectromètre de masse. L'ionisation est obtenue par ESI (sonde HESI-II) en ionisation négative sur le LTQ-Orbitrap Velos Pro électrospray. Le voltage du spray est de 3,3 kV. La température de chauffage de la sonde est de 200°C. La température du capillaire est fixée à 325°C. L'analyse est réalisée en mode négatif pour obtenir l'information sur la structure des chaînes d'acides gras des phospholipides. Le spectromètre de masse est équipé de deux analyseurs : une double trappe ionique (LTQ) pour la fragmentation à basse résolution et une trappe orbitale (ou orbitrap) pour une détection à haute résolution. La détection est réalisée en full scan avec une résolution de 100 000 pour l'identification des PL. Cette information est complétée par la fragmentation MS2 et MS3 dans le mode dépendant des données (Energie de collision à 35% pour la MS2 et MS3). Pour l'identification des espèces de phospholipides, la loi d'attribution est la même que celle présentée dans le paragraphe précédent (§ III.4.3.3).

Le spectre de haute résolution permet de confirmer la formule brute du phospholipide considéré et les spectres MS2/MS3 de visualiser la structure fine de l'espèce par l'identification de ses chaînes alkyl. Elle permet aussi de quantifier les classes de phospholipides. Cette méthode a été utilisée grâce à une collaboration avec P. Chaminade (LYP(SYS)²) et A. Solgadi (SAMM).

III.5 ANALYSE ET QUANTIFICATION DES LIPIDES PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE COUPLEE AU DETECTEUR EVAPORATIF A DIFFUSION DE LUMIERE

Le détecteur évaporatif à diffusion de lumière (DEDL) est un détecteur dit « universel » permettant d'analyser des molécules dépourvues de chromophores exploitables. Il permet la détection de composés moins volatils que la phase mobile qui les solubilise. Il est donc particulièrement adapté à la détection des lipides, y compris des lipides neutres. Au sortir de la colonne chromatographique, la phase mobile renfermant les composés chromatographiés est nébulisée à l'aide d'un nébuliseur pneumatique sous l'action d'un gaz sous pression (air ou diazote usuellement). Le nébulisât ainsi formé, transporté par le gaz de nébulisation, traverse un tube chauffé (environ 35~50°C) ou tube évaporateur. Le passage dans le tube évaporateur a pour but d'évaporer (au moins partiellement) le liquide porteur, ceci, afin de ne conserver que les microparticules des composés à analyser. Ces particules d'analytes vont ensuite entrer dans la chambre de détection située dans l'axe du tube évaporateur. La chambre de détection comprend une source lumineuse (qui peut être un laser ou, plus fréquemment, une simple ampoule tungstène-halogène) qui illumine le brouillard formé par les particules de soluté portées par le gaz de nébulisation. Un photomultiplicateur placé à un angle de 120° par rapport à la direction de source lumineuse collecte les photons diffusés. L'intensité de la lumière diffusée est ensuite envoyée à un système d'acquisition pour l'exploitation des données chromatographiques.

La séparation des différentes classes de lipides est réalisée par chromatographie liquide en phase normale. La chaîne chromatographique utilisée pour le dosage est une HP1050 (Hewlett-Packard GmbH, Allemagne) constituée d'un injecteur automatique, d'une pompe quaternaire et d'un dégazeur. La séparation est menée à 40°C sur une colonne de Silice inertsil SI, 120 Å, 150x2,1 mm, 5 μm

(Interchim, France). Le gradient d'élution est une adaptation de celui publié par Gerits et collaborateurs (2013) (Tableau 2.11), qui reste confidentiel pour le moment. Le protocole d'élution consiste en une combinaison d'un éluant A (isooctane), un éluant B (acétone : acétate d'éthyle (2:1, v/v) contenant 70 mM d'acide acétique) et d'un éluant C (propan-2-ol : eau (85:15, v/v) contenant 7,5 mM d'acide acétique et 7,5 mM de triéthylamine), dont les proportions varient au cours de l'élution (Tableau 2.11). Le débit est de 0,8 mL.min⁻¹. Un volume de 10 µL d'échantillon (extrait de lipides totaux) est injecté à la concentration de 1 g.L⁻¹ dans du chloroforme.

Tableau 2.11 : Gradient d'élution (Gerits et al., 2013).

| Temps d'élution (min) | Eluant A (%) | Eluant B (%) | Eluant C (%) | Eluant D (%) | Débit (mL.min ⁻¹) |
|--------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------------------------|
| 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | 1,4 |
| 1,5 | 100 | 0 | 0 | 0 | 1,4 |
| 1,6 | 97 | 3 | 0 | 0 | 1,4 |
| 6 | 94 | 6 | 0 | 0 | 1,4 |
| 8 | 50 | 50 | 0 | 0 | 1,4 |
| 8,1 | 47 | 38 | 15 | 0 | 1,4 |
| 14 | 47 | 29 | 24 | 0 | 1,4 |
| 18 | 40 | 0 | 60 | 0 | 1,4 |
| 23 | 40 | 0 | 60 | 0 | 1,4 |
| 23,1 | 0 | 100 | 0 | 0 | 3 |
| 25 | 0 | 100 | 0 | 0 | 3 |
| 25,1 | 0 | 0 | 0 | 100 | 3 |
| 27 | 0 | 0 | 0 | 100 | 3 |
| 30 | 100 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| 35 | 100 | 0 | 0 | 0 | 3 |

A = isooctane ; B = acétone : acétate d'éthyle (2:1, v/v) contenant 70 mM d'acide acétique ; C = propan-2-ol : eau (85:15, v/v) contenant 7,5 mM d'acide acétique et 7,5 mM de triéthylamine ; D = propan-2-ol.

La quantification de différentes familles de lipides est réalisée sur un DEDL 31 (EUROSEP, France). Une courbe d'étalonnage pour chaque famille de lipides est réalisée à partir de différentes solution de standards appropriés : MAG (18:0), DAG (16:0), TAG (18:0), cholestéryl palmitate et un acide gras libre (18:0).

La caractérisation des classes d'esters de stérols (EST), ainsi que la composition en acides gras des différentes familles de lipides non phosphorés est réalisée par chromatographie liquide sur un système RSLC Ultimate-3000, de chez Dionex Thermofisher couplé à un spectromètre de masse LTQ-Orbitrap Velos Pro, Thermofisher (système décrit dans le § III.4.3.4). La source d'ionisation chimique à pression atmosphérique est choisie pour l'expérimentation. Cette source permet l'analyse

des acides gras présents dans les lipides en mode négatif et renseigne sur la famille de stérols en mode positif.

Ces méthodes ont été utilisées grâce à une collaboration avec P. Chaminade et S. Abreu (LYP(SYS)²).

III.6 ANALYSE DES ACIDES GRAS DES LIPIDES TOTAUX ET DES PHOSPHOLIPIDES TOTAUX DES MATRICES

III.6.1 Quantification des acides gras polyinsaturés n-3 par RMN du proton

Par le déplacement particulier du groupement méthyl terminal des acides gras, il est possible de réaliser une quantification relative des AGPI n-3 par rapport aux autres acides gras par RMN ¹H. Les mesures sont réalisées sur le même spectromètre et dans les mêmes conditions de préparation des échantillons que celles décrites dans le paragraphe III.4.2. Les expériences sont menées à une fréquence de 400 MHz et acquises avec une impulsion classique de 90°. Les paramètres d'acquisition sont les suivants : fenêtre spectrale de 4 kHz, largeur de pulsion de $\pi/2$ de 15 μ s et temps de relaxation de 10 s et 8 scans. Tout comme pour la RMN ³¹P, une transformée de Fourier est appliquée. Le groupement méthyl terminal des AGPI n-3 a un déplacement chimique aux alentours de 0,88 ppm représenté sous la forme d'un triplet. Le groupement méthyl terminal des autres acides gras a un déplacement chimique aux alentours de 0,75 ppm sous la forme d'un massif (Gribbestad et al., 2005 ; Nieva-Echevarría et al., 2015) (Figure 2.8).

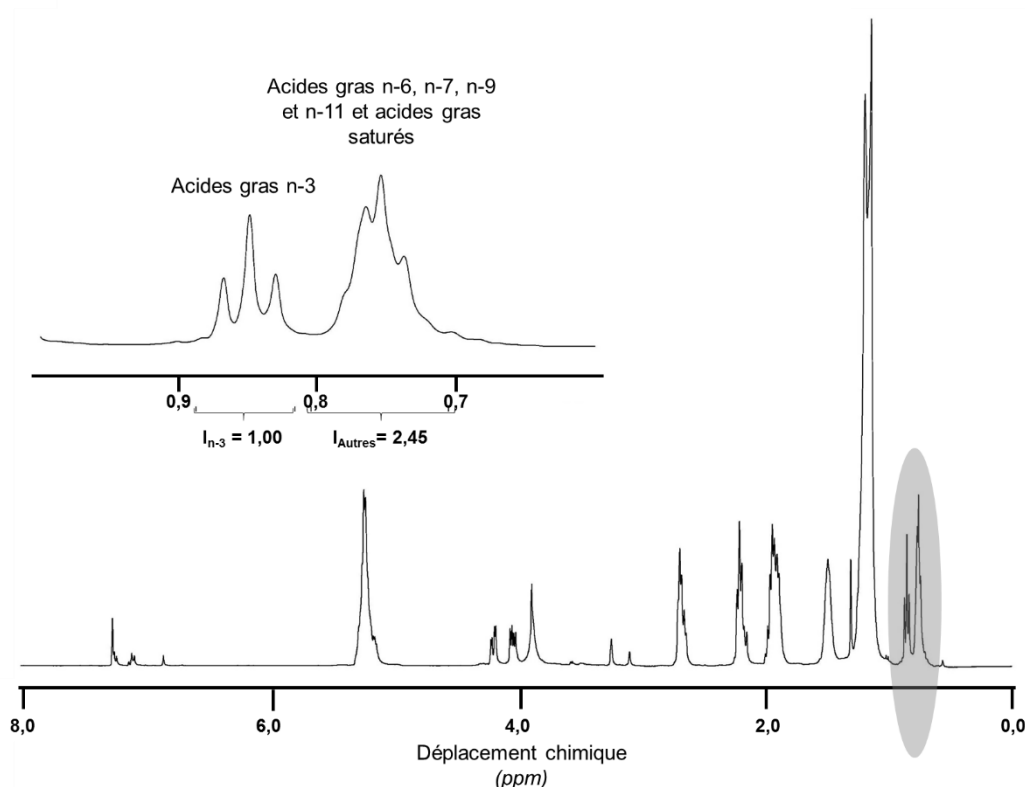


Figure 2.8 : Spectre RMN ^1H obtenu à partir des lipides totaux du tourteau de cameline Bioplanète.

Le pourcentage en mole d'AGPI n-3 est donné par :

$$\% \text{mol AGPI n-3} = 100 \times \frac{I_{n-3}}{I_{n-3} + I_{\text{autres}}}$$

où I_{n-3} est l'intensité du massif correspondant aux AGPI n-3

I_{autres} est l'intensité du massif correspondant aux autres acides gras.

III.6.2 Analyse des acides gras par chromatographie en phase gazeuse

III.6.2.1 Préparation des esters méthyliques d'acide gras

Les lipides totaux et les phospholipides totaux sont transméthylés en présence de trifluorure de bore dans du méthanol (Morrison and Smith, 1964). Les extraits sont amenés à sec par un flux d'azote, puis 1 mL de solution de trifluorure de bore est ajouté. Après fermeture hermétique des tubes, la transméthylation des échantillons est réalisée dans un bain d'huile à 100°C avec un temps d'incubation de 90 minutes. Après refroidissement et ajout d'1 mL d'eau, les esters méthyliques d'acides gras (EMAG) sont extraits, par trois fois, par 2 mL d'hexane. L'ensemble des phases organiques est concentré puis lavé avec 1 mL d'eau distillée. Les EMAG contenus dans la phase organique finale sont stockés à -20°C en attente de leur analyse par chromatographie en phase gazeuse (CPG).

III.6.2.2 Conditions chromatographiques pour l'analyse des EMAG

Les EMAG des lipides totaux et des phospholipides totaux sont analysés par CPG. Le chromatographe (GC 2010 plus, Shimadzu, Japon) est équipé d'une colonne capillaire BPX 70 (SGE) de silice greffée hautement polaire (longueur = 60 m, diamètre interne = 0,25 mm, épaisseur du film = 0,25 μm) et d'un détecteur à ionisation de flamme maintenu à une température de 280°C. L'injecteur est à une température de 250°C. La pression d'entrée du gaz vecteur (hydrogène, débit = 1 mL.min⁻¹) est fixée à 0,1 MPa. Le volume de solution injecté est de 2 μL en mode split (rapport de fuite compris entre 1:50 et 1:60). La programmation de la colonne est la suivante : la température croît de 1,3°C.min⁻¹, entre 150°C et 200°C. Une température de 200°C est maintenue pendant 30 minutes avant de ré-augmenter à raison de 20°C.min⁻¹ jusqu'à 250°C, température maintenue ensuite pendant 30 minutes.

Les données sont collectées et intégrées par le logiciel GC solution v2.4 integration system (Shimadzu). L'identification des acides gras des échantillons est obtenue par comparaison des temps de rétention avec ceux d'un mélange d'EMAG référence C4-C24, chromatographiés dans les mêmes conditions et sur le même chromatographe que les échantillons. Les variations dans la détermination des aires de surfaces entre les injections d'un même échantillon sont de moins de 2%.

L'ensemble des caractérisations des matrices est répertorié dans le tableau 2.12.

Tableau 2.12 : Nombre de caractérisations réalisées sur les différentes matrices.

| Matrices | Sésame | Noix | Chanvre | Cameline <i>Bioplanète</i> | Cameline <i>Iterg</i> | Lin | Coquille Saint Jacques |
|---|----------------|----------------|----------------|-------------------------------|--------------------------|----------------|---------------------------|
| Teneur en eau | 1 | 2 | 2 | 4 | 5 | 4 | 3 |
| Extraction des LT | 4 | 6 | 6 | 10 | 6 | 8 | 9 |
| Composition en AG des LT | | | | | | | |
| - CPG | 1 | 1 | 1 | 2 ^c | 2 | 1 | 1 |
| - RMN ¹ H | 2 ^a | 2 ^a | 2 ^a | 2 ^a | 6 | 2 ^a | 6 ^b |
| Dosage des : | | | | | | | |
| - TAG et AGL (LC-DEDL) | 12 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | |
| - PL | 2 | | | | | | |
| • Ames (à partir des PL purifiés) | | 2 | 2 | 5 ^d | 0 | 2 | 4 ^e |
| • RMN ³¹ P (à partir des LT) | | 2 | 2 | 2 | 5 | 2 | 5 ^f |
| Classe des PL (à partir des LT) | | | | | | | |
| - RMN ³¹ P | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 4 |
| - LC-MS phase inverse | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| Espèces de PL : | | | | | | | |
| - Shotgun (à partir des PL) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| - LC-MS phase inverse (à partir des LT) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| Composition en AG des PL | | | | | | | |
| - CPG | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 2 ^g |
| - RMN ¹ H | 1 | 1 | 1 | 2 | 0 | 1 | 1 |

^a 2 extractions indépendantes dont une avec 6 répétitions de l'analyse sur le même extrait lipidique.

^b 6 extractions indépendantes dont une avec 7 répétitions de l'analyse sur le même extrait lipidique.

^c 2 extractions indépendantes dont une avec 2 préparations d'EMAG indépendantes et une avec 3 préparations d'EMAG indépendantes.

^d 5 extractions indépendantes dont une avec 2 répétitions de l'analyse sur le même extrait lipidique, mais extraction de PL différentes.

^e 4 extractions indépendantes dont une avec 2 répétitions de l'analyse sur le même extrait lipidique, mais extraction de PL différentes.

^f 5 extractions indépendantes dont deux avec 2 répétitions de l'analyse sur le même extrait lipidique.

^g 2 extractions indépendantes dont une avec 3 répétitions de l'analyse sur le même extrait lipidique, mais extraction de PL différentes.

LT : lipides totaux ; AG(L) : acides gras (libres) ; CPG : chromatographie en phase gazeuse ; TAG : triglycérides ; PL : phospholipides ; LC-DEDL : chromatographie liquide couplée à un détecteur évaporatif à diffusion de lumière ; LC-MS : chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse ; CCM : chromatographie en couche mince.

IV. Préparation et caractérisation des liposomes / éthosomes

IV.1 PREPARATION DES LIPOSOMES/ETHOSOMES

IV.1.1 Liposomes

La formulation des liposomes est faite à partir de diverses sources de phospholipides : lécithines commerciales et extraits supercritiques (Tableau 2.13.A et 2.13.B). Pour les lécithines commerciales, qui se présentent sous forme d'un liquide visqueux ou d'une poudre, une masse précise est prélevée et introduite dans un ballon de 50 mL. Pour les extraits supercritiques, un volume de solution éthanolique est prélevé à la micropipette, calculé à partir de la concentration en phospholipides de l'échantillon, obtenu par la RMN ^{31}P . Ce volume est introduit dans un ballon de 50 mL puis séché à l'aide d'un évaporateur rotatif. On obtient un film lipidique. Le ballon contenant les phospholipides (sous forme de poudre, liquide ou d'un film) est plongé dans un bain d'eau à une température de $30 \pm 4^\circ\text{C}$. L'eau déionisée est introduite au goutte à goutte dans le ballon à l'aide d'une burette graduée de $50 \pm 0,05$ mL avec un débit de $0,7 \pm 0,3$ ou $4,1 \pm 0,7$ mL.min $^{-1}$. Le volume d'eau ajouté dépend de la masse initiale et de la concentration finale en phospholipides (1 mg.mL $^{-1}$ et 9,9 mg.mL $^{-1}$). L'agitation est maintenue tout au long de la manipulation par un barreau aimanté présent dans la suspension (plaque d'agitation HSC Velp Scientifica, réglage 8/10).

De l'azide de sodium (25 μL d'une solution à 0,28 mg.mL $^{-1}$) est ajouté aux suspensions de liposomes. Cette concentration en azide de sodium est déterminée de manière à ne pas induire de biais dans les mesures de potentiel zêta sur les suspensions (Annexe 3).

IV.1.2 Ethosomes

Les éthosomes sont préparés par la méthode de coacervation. Les suspensions de lécithines commerciales sont préparées dans de l'éthanol à 96% à des concentrations en lipides variables, tandis que les phospholipides extraits par fluide supercritique sont déjà en solution dans de l'éthanol (96%) (Tableau 2.13.A et 2.13.B). Le choix des concentrations en phospholipides des suspensions initiales est dicté par les teneurs en phospholipides présents dans les extraits supercritiques. Le protocole appliqué pour la préparation des éthosomes est le suivant : 1 mL de la solution de lipides est prélevé et introduit dans un ballon de 50 mL, plongé dans un bain d'eau à une température de $30 \pm 4^\circ\text{C}$. L'eau déionisée est ajoutée à l'aide d'une burette graduée de $25 \pm 0,05$ mL au goutte à goutte avec un débit de $0,7 \pm 0,3$ ou $4,1 \pm 0,7$ mL.min $^{-1}$. L'agitation est maintenue tout au long de la manipulation par un barreau aimanté (plaque d'agitation HSC Velp Scientifica, réglage 8/10). Le volume d'eau ajouté dépend du pourcentage d'éthanol souhaité dans la suspension finale (10, 20 ou 30%vol d'éthanol). La concentration finale en phospholipides est fixée à 1 mg.mL $^{-1}$.

Tableau 2.13 : Paramètres testés et nombre d'essais pour la préparation des liposomes/éthosomes à partir de lécithines commerciales (A) et de PL extraits par fluide supercritique (B).**A : Paramètres testés et nombre d'essais pour la préparation des liposomes/éthosomes à partir de lécithines commerciales.**

| Echantillon | Lecisoya P97 | | Lipoid P30 | | Lipoid P75 | | Lipoid P100 | | LC 60 | |
|---|------------------|------------------|------------|-----|------------|-----|-------------|-----|-------|-----|
| Débit burette (<i>mL.min⁻¹</i>) | 0,7 ^a | 4,1 ^b | | 4,1 | | 4,1 | | 4,1 | 0,7 | 4,1 |
| [PL]_{finale} (<i>mg.mL⁻¹</i>) | 1 | 1 | 9,9 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 9,9 |
| Liposome | 0 | 9 | 3 | 1 | 1 | 1 | 1 | | 3 | 3 |
| Ethosome | 10 | 1 | 2 | | | | | | | |
| %vol EtOH | 20 | 7 | 5 | | | | | | 3 | 3 |
| | 30 | 1 | 3 | | | | | | | |

^a Ecart-type de 0,3 mL.min⁻¹^b Ecart-type de 0,7 mL.min⁻¹

PL : phospholipides ; EtOH : Ethanol.

B : Paramètres testés et nombre d'essais pour la préparation des liposomes/éthosomes à partir des extraits supercritiques.

| Echantillon | EFS Cameline 10 F2 | | EFS Cameline 18 F2 | | EFS St Jacques 13 F2 | |
|---|--------------------|------------------|--------------------|-----|----------------------|-----|
| Débit burette (<i>mL.min⁻¹</i>) | 0,7 ^a | 4,1 ^b | 0,7 | 4,1 | 0,7 | 4,1 |
| [PL]_{finale} (<i>mg.mL⁻¹</i>) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Liposome | 0 | 2 | | 1 | 1 | 1 |
| Ethosome | 20 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 |

^a Ecart-type de 0,3 mL.min⁻¹^b Ecart-type de 0,7 mL.min⁻¹

PL : phospholipides ; EtOH : éthanol.

IV.2 CARACTERISATION DES LIPOSOMES/ETHOSOMES

IV.2.1 Microscopie optique à contraste interférentiel différentiel

Le microscope à contraste interférentiel différentiel est un Olympus BX51 (Japon) équipé d'une caméra Color View u-CMAD3. Il exploite les interférences de deux faisceaux lumineux traversant un échantillon. La microscopie optique permet de visualiser la taille des vésicules formées au-dessus de 400 nm. Les observations sont faites avec un objectif x100 plongeant dans de l'huile d'immersion.

IV.2.2 Diffusion dynamique de la lumière

La distribution de taille des liposomes/éthosomes est déterminée par la diffusion dynamique de la lumière (DLS) (Vasco, Cordouan, France). Cette technique d'analyse permet d'accéder à la taille de particules. Le principe repose sur des fluctuations temporelles de l'intensité diffusée par des particules (indice de réfraction des liposomes de 1,45 (Blessing et al., 1998)) en suspension dans un liquide. Un laser de longueur d'onde de 657 nm est utilisé. Les données sont enregistrées par un détecteur positionné à 135° en zone de rétrodiffusion des particules animées d'un mouvement brownien. Il en résulte alors des interférences constructives ou destructives au cours du temps, qui se traduisent par une courbe d'autocorrélation en intensité puis en vitesse. L'analyse de cette courbe permet de remonter au rayon hydrodynamique des particules. Le traitement et l'analyse des données sont effectués à l'aide du logiciel NanoQ (Cordouan, France) par l'utilisation de l'algorithme de Padé-Laplace. Cette méthode est pertinente pour mesurer des tailles d'objets entre 50 et 400 nm. Elle nécessite de connaître les indices de réfraction du milieu continu à 20°C (Tableau 2.14).

Tableau 2.14 : Indice de réfraction des milieux de dispersion des liposomes/éthosomes (Kolodner et al., 1988).

| Milieu de dispersion | | Indice de réfraction |
|----------------------|----------|----------------------|
| Eau | | 1,333 |
| 10% EtOH | | 1,338 |
| Mélange Eau/EtOH | 20% EtOH | 1,344 |
| | 30% EtOH | 1,351 |

EtOH : éthanol.

IV.2.3 Zétamétrie

Le potentiel zêta (ζ) rend compte de la charge électrique qu'une particule acquiert grâce au nuage d'ions qui l'entoure quand elle est en suspension.

Un champ électrique alternatif est appliqué entre deux électrodes immergées en profondeur dans la suspension colloïdale. Grâce aux forces électrostatiques (force de frottement et champ électrique),

les particules chargées entre les électrodes subissent un mouvement de translation, dont la vitesse est directement proportionnelle au champ électrique (E) appliqué et à un facteur μ_e appelé mobilité électrostatique, paramètre que l'appareil mesure. A partir de cette donnée, il est possible de déterminer le potentiel zêta, potentiel électrostatique associé à une particule de rayon hydrodynamique (R_h) et de charge q, par la formule :

$$\zeta = \mu_e \frac{\eta}{\epsilon} b$$

avec $b = 6\pi\bar{0}$

$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta R_h}$$

Le tableau 2.15 reporte les valeurs de viscosité (η) et de constante diélectrique (ϵ) des milieux utilisés.

Tableau 2.15 : Viscosité et constante diélectrique des milieux de dispersion des liposomes/éthosomes (à $T=20^\circ\text{C}$) (d'après Khattab et al., 2012 et Åkerlöf, 1932).

| Milieu de dispersion | | Viscosité (Pa.s) | Constante diélectrique (F.m ⁻¹) |
|----------------------|----------|---------------------|--|
| Eau | | 1,003 | 80,37 |
| Mélange Eau/EtOH | 10% EtOH | 1,2887 | 75,05 |
| | 20% EtOH | 1,8106 | 70,30 |
| | 30% EtOH | 2,3133 | 65,32 |

EtOH : éthanol.

Selon le milieu dans lequel la mesure du potentiel zêta est réalisée, deux approximations peuvent être appliquées lors de la conversion de la mobilité électrique du système en potentiel zêta. L'approximation de Smoluchowski est celle employée lors de l'utilisation de solvants aqueux. Les mesures de potentiel zêta sont réalisées sur un zétamètre Wallis (Cordouan, France). Le traitement et l'analyse des données sont effectués à l'aide du logiciel ZétaQ (Cordouan, France).

V. Traitement statistique des données

Les traitements statistiques des données sont réalisés grâce au logiciel R en utilisant l'interface R Studio (Opensource). Les données sont exprimées par des valeurs moyennes avec leurs écarts types. Après s'être assuré que les échantillons indépendants suivent une loi normale par le test de Shapiro et Wilk et un test d'égalité des variances, les comparaisons intergroupes sont réalisées sur la base de leurs moyennes respectives. La significativité est vérifiée par une analyse de variance (ANOVA). L'ANOVA à un facteur est utilisée pour tester les paramètres suivants :

- la teneur en lipides totaux des matrices ;
- la composition en acides gras des lipides totaux et des phospholipides ;
- la méthode de dosage des phospholipides (RMN ^{31}P - dosage de Ames) ;
- la teneur en phospholipides des matrices.

Dans les quatre cas cités, le nombre de répétition des expériences pour les dosages ou la composition en AG sera indiqué en dessous de chaque tableau.

Les groupes sont ensuite comparés deux à deux par le test post-hoc dit de Tuckey. Les données sont considérées comme différentes pour une p-value $<0,05$ et signalées par des lettres différentes.

Chapitre 3 : *Résultats et discussion*

I. Caractérisation des matrices végétales et animale

I.1 GENERALITES SUR LES OLEAGINEUX ETUDIES

Cette partie introductive sur les matrices végétales utilisées vise à appréhender la complexité de la composition en lipides des graines et fruit, des huiles et des tourteaux. Les références citées ne constituent pas une liste exhaustive de ce qui peut être trouvé dans la littérature, notamment pour la composition des huiles où les données sont abondantes. Néanmoins, en ce qui concerne les tourteaux, nous nous sommes attachés à recenser les publications présentant des données sur les compositions lipidiques.

Les plantes oléagineuses sont caractérisées par des graines ou des fruits riches en huile. Les plus connues du grand public sont le soja, le colza et le tournesol dont les teneurs en huile des graines sont, respectivement, de 18, 42 et 44%¹. Cependant, d'autres sources sont également intéressantes. Leur valorisation permet de diversifier la qualité nutritionnelle des huiles. Parmi ces sources, peuvent être citées les graines de cameline, de lin, de chanvre ou de sésame et la noix.

Différentes valeurs de composition sont présentées par la suite, pour la graine ou le fruit entier, l'huile et le tourteau. Il est important de remarquer que la comparaison exacte de ces valeurs est souvent délicate par manque de précision sur :

- la variété des plantes, leurs conditions de culture et leurs conditions climatiques ;
- les conditions de trituration et de stockage des tourteaux avant analyse ;
- les techniques analytiques utilisées ;
- les références utilisées pour exprimer les résultats (graine, matière sèche, lipides totaux).

I.1.1 La cameline (*Camelina sativa*)

La cameline, de la famille des brassicacées, est une plante dont la culture demande peu de ressources en termes d'azote et d'eau (Figure 3.1) (Shukla et al., 2002). La graine de cameline se caractérise par une teneur élevée en lipides (Tableau 3.1.A). Selon les études et la base de calcul (matière sèche ou graine humide), la teneur en lipides totaux se situe entre 30 et 45% et peut varier suivant les conditions climatiques : la graine dite d'hiver est plus riche en huile que la graine d'été (respectivement, $45,3 \pm 0,8\%$ et $42,3 \pm 1,1\%$) (Zubr, 1997). La fraction huileuse est composée à 96% de triglycérides, 0,3% de phospholipides, environ 1% de monoglycérides et d'acides gras libres (AGL). Les phospholipides de la cameline sont représentés à plus de 75% par PC et PI. La phosphatidyléthanolamine et l'acide phosphatidique sont aussi détectés mais représentent moins de 10% des phospholipides.

¹<http://www.prolea.com/index.php?id=1278>



Figure 3.1 : Fleurs et graines de cameline.

La graine contient aussi des stérols (Tableau 3.1.A). et des composés phénoliques représentant 3,2 mg équivalent d'acide gallique.g⁻¹ (Quezada and Cherian, 2012). Parmi les composés phénoliques, on trouve des molécules antioxydantes, telles que les flavonoïdes (11,6 mg équivalent quercétine.g⁻¹) (Quezada and Cherian, 2012). Les flavonoïdes sont représentés essentiellement par la catéchine, la quercétine et la rutine. D'autres molécules antioxydantes sont aussi détectées dans la graine de cameline telles que les quatre espèces de tocophérol, avec une prédominance du γ -tocophérol (Quezada and Cherian, 2012; Budin et al., 1995). Enfin, les brassicacées sont caractérisées par la présence de l'acide sinapique et de la sinapine (Terpinc et al., 2012). La sinapine, ester choline de l'acide sinapique, participe dans les plantes à la biosynthèse des flavonoïdes (Mailer et al., 2008). Elle intervient aussi dans la biosynthèse des lignines, molécules issues des lignanes. Ce composé est néanmoins classé dans la catégorie des anti-nutriments, à cause du goût amer qu'il donne aux aliments, diminuant ainsi l'appétence des animaux pour la cameline ou les produits de transformation issus de la cameline. L'étude de la composition en acides gras des lipides totaux identifie l'acide α -linoléique comme l'acide gras majoritaire (entre 33 et 38% des acides gras totaux) suivi de l'acide oléique et l'acide linoléique (entre 13 et 20% chacun). La particularité de la graine de cameline réside dans la présence d'acides gras composés de 20 atomes de carbone et plus tels que l'acide 11-éiconénoïque (20:1 n-9) et l'acide érucique (22:1 n-9).

La graine de cameline se caractérise aussi par une teneur élevée en protéines (environ 42%) (Quezada and Cherian, 2012) et une teneur en glucides de l'ordre de 15% (Zubr, 2003). Dans la catégorie des glucides, on trouve une quantité de glucosinolates, variant de 4,9 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ de graine (Quezada and Cherian, 2012) à 36 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ de graine (Matthäus and Zubr, 2000). A forte dose, le glucosinolate peut être délétère pour les organismes entraînant une hypertrophie du foie et des reins et une diminution de la ponte des œufs (Cartea and Velasco, 2008 ; Tripathi and Mishra, 2007). Enfin, une activité inhibitrice de la trypsine (enzyme digestive du suc pancréatique, impliquée dans la dégradation des protéines et présente dans la plupart des animaux) est aussi détectée (1,9 à 11,7 mg.g⁻¹ de graine) (Zubr, 2003).

L'huile extraite des graines de cameline se caractérise par une composition en acides gras similaire à celle de la graine, avec notamment la présence majoritaire de l'acide α -linoléique (18:3 n-3) (plus de 30% des acides gras totaux) (Tableau 3.1.B). L'acide érucique est aussi présent, ce qui

peut être un inconvénient dans la commercialisation de cette huile. Cet acide gras serait impliqué dans des pathologies cardio-vasculaires chez le rat, lipidose et nécrose du myocarde (Kramer et al., 1992), mais aucun effet probant n'a été démontré chez l'Homme. Néanmoins, par mesure de précaution, la limite maximale d'acide érucique dans les huiles est de 5%mass pour la consommation humaine dans l'Union Européenne (Directive 76/621/CEE, du 20 juillet 1976, révisée en 2014 par le parlement européen D032022/02). L'huile de cameline est composée de stérols, principalement le β -sitostérol (50% des stérols) (Kirkhus et al., 2013 ; Shukla et al., 2002). De plus, elle se caractérise par une teneur élevée en cholestérol pour une huile végétale (entre 5 et 7% des stérols). Dans l'huile, comme mentionné pour les graines, le γ -tocophérol est l'espèce prédominante parmi les tocophérols (Kirkhus et al., 2013). L'acide sinapique ainsi que la sinapine sont aussi identifiés dans l'huile (Terpinc et al., 2012).

Très peu de publications reportent la composition du tourteau de cameline (11 publications, mots clés dans le titre : camelina cake, Scopus à comparer avec les 328 publications contenant dans le titre camelina, Scopus). Le tourteau de cameline est riche en protéines (Szumacher-Strabel et al., 2011 ; Zubr, 1997) (Tableau 3.1.C). Il peut aussi contenir entre 9,9 et 24,6% de lipides selon le rendement d'extraction de l'huile (Quezada and Cherian, 2012 ; Szumacher-Strabel et al., 2011 ; Zubr, 1997). Le profil en acides gras des lipides totaux du tourteau est similaire à celui de la graine et de l'huile. Les composés phénoliques trouvés dans la graine sont aussi identifiés dans le tourteau (Terpinc et al. 2012). Ces composés phénoliques sont constitués de flavonoïdes (Tableau 3.1.C), d'acide sinapique ($427 \mu\text{g.g}^{-1}$ de tourteau) et de sinapine ($1,4 \text{ mg.g}^{-1}$ de tourteau) (Salminen et al., 2006). Dans le tourteau, on mesure la présence de vitamine E, dont le principal représentant est le γ -tocophérol (Tableau 3.1.C). Enfin, la présence de glucosinolates dans le tourteau est détectée ($14,5$ à $23,4 \mu\text{mol.g}^{-1}$ de tourteau) (Matthäus and Zubr, 2000).

Tableau 3.1 : Principaux composés de la graine (A), de l'huile (B) et du tourteau de cameline (C).

A : Composition en lipides de la graine de cameline.

| | Budin et al., 1995 | Quezada and Cherian, 2012 | Zubr, 2003 | Mansour et al., 2014 |
|---|--|--------------------------------------|----------------------------|----------------------|
| Lipides (%mass) | 30 à 36,5 (mat. sèche) | 38,9 (graine) | 43,3 ± 0,2 (mat. sèche) | 40,9 (mat. sèche) |
| - Triglycérides (%mass de lipides) | | | | 96,0 |
| - Monoglycérides (%mass de lipides) | | | | 0,8 |
| - Phospholipides (%mass de lipides) | | | | 0,3 |
| | PC+PI | | | 78,9 |
| (%PL) | PE | | | 6,8 |
| | PA | | | 4,7 |
| | PS | | | 1,4 |
| - Acides gras libres (%mass de lipides) | | | | 0,8 |
| - Stérols libres (%mass de lipides) | | | | 0,4 |
| - Esters de stérols/esters de cires/ hydrocarbones (%mass de lipides) | | | | 1,4 |
| - Composés phénoliques (mg de GAE.g ⁻¹ de graine) | | 3,2 | | |
| - Vitamine E | 17,4 mg.100 g ⁻¹ de graine | | | |
| α-tocophérol | 10% | 2,8 µg.g ⁻¹ de graine | | |
| β-tocophérol | 6% | | | |
| γ-tocophérol / β-tocotrienol | 82% | 85,2 µg.g ⁻¹ de graine | | |
| δ-tocophérol | 2% | | | |
| α-tocotrienol | tr | | | |
| - Flavonoïdes (mg éq de quercitrine.g ⁻¹ de graine) | | 11,6 | | |
| AG des lipides totaux (%) | | | | |
| 16:0 | | 6,5 | 5,3 ± 0,1 | 12,8 |
| 16:1 | | 0,3 | 0,1 | |
| 18:0 | | 2,5 | 2,7 ± 0,0 | 2,7 |
| 18:1 (n-9) | | 17,5 | 13,4 ± 0,1 | 25,4 |
| 18:2 (n-6) | | 19,0 | 14,8 ± 0,1 | 28,4 |
| 18:3 (n-6) | | | | |
| 18:3 (n-3) | | 33,2 | 37,8 ± 0,2 | 20,6 |
| 20:0 | | | 1,3 ± 0,0 | 0,7 |
| 20:1 (n-9) | | 15,6 | 15,4 ± 0,2 | 3,0 |
| 20:2 (n-6) | | 1,7 | 2,0 ± 0,0 | 0,8 |
| 22:1 (n-9) | | | 2,8 ± 0,1 | 0,7 |
| Autres | | 1,0 | 4,5 | 4,9 |

mat. : matière ; PL : phospholipides ; PC : phosphatidylcholine ; PI : phosphatidylinositol ; PE : phosphatidyléthanolamine ; PA : acide phosphatidique ; PS : phosphatidylsérine ; GAE : équivalent d'acide gallique ; AG : acide gras ; tr. : trace.

B : Composition de l'huile de cameline.

| | Budin et al., 1995 | Shukla et al., 2002 | Zubr 1997 | Kirkhus et al., 2013 |
|---|--------------------|---------------------|-------------|----------------------|
| AG des lipides totaux (%) | | | | |
| 16:0 | 6,4 | 5,3 ± 0,1 | 5,3 – 5,6 | 5 |
| 16:1 | | | 0,2 | |
| 18:0 | 2,8 | 3,0 ± 0,0 | 2,2 – 2,7 | 2 |
| 18:1 (n-9) | 15,9 | 18,7 ± 0,1 | 14,7 – 16,5 | 13 |
| 18:2 (n-6) | 20,9 | 16,0 ± 0,1 | 12,9 – 16,3 | 15 – 16 |
| 18:3 (n-6) | | | | |
| 18:3 (n-3) | 30,7 | 38,1 ± 0,1 | 33,7 – 40,3 | 36 – 39 |
| 20:0 | | 1,4 ± 0,1 | 1,2 – 1,5 | |
| 20:1 (n-9) | 13,6 | 11,6 ± 0,1 | 14,7 – 15,1 | 15 |
| 20:2 (n-6) | | | 1,8 – 1,9 | |
| 22:1 (n-9) | 3,0 | 2,5 ± 0,1 | 2,5 – 3,0 | 3 |
| Autres | | 3,4 ± 0,1 | 2,9 – 3,5 | |
| Stérols totaux^a | | | | |
| (mg.g ⁻¹ de lipides) | | 3,6 ± 0,3 | | |
| Cholestérol | | 0,2 ± 0,0 | | 0,3 |
| Brassicastérol | | 0,1 ± 0,0 | | 0,4 |
| Campestérol | | 0,9 ± 0,0 | | 1,1 |
| Stigmastérol | | 0,1 ± 0,0 | | |
| β-Sitostérol | | 1,9 ± 0,1 | | 2,2 – 2,4 |
| Δ ⁵ -Avenastérol | | 0,4 ± 0,0 | | 0,3 – 0,4 |
| Tocophérols (μg.g⁻¹ de lipides) | | | | |
| α-tocophérol | | | 24 – 26 | |
| γ-tocophérol | | | 661 – 787 | |
| δ-tocophérol | | | 9 – 14 | |

AG : acide gras.

C : Composition du tourteau de cameline.

| | Szumacher-Strabel et al., 2011 | Quezada and Cherian, 2012 | Nain et al., 2015 | Salminen et al., 2006 |
|---|-----------------------------------|---|--------------------|---|
| Contenu en eau (%mass de tourteau) | 7,4 | | 8,1 | |
| Protéines (%mass) | 30,5 (mat. sèche) | | 34,3 (tourteau) | |
| Fibres (%mass) | 10,2 (mat. sèche) | | 9,4 (tourteau) | |
| Lipides (%mass) | 13,9 (mat. sèche) | 9,9 – 24,6 (tourteau) | 21 (tourteau) | |
| - Composés phénoliques | | 3420 – 4591,8 µg GAE.g ⁻¹ | | 6 200 ± 490 µg GAE.g ⁻¹ de tourteau |
| - Flavonoïdes | | 19,5 – 23,0 mg de quercétine.g ⁻¹ | | 236 ± 37 mg GAE.g ⁻¹ de tourteau |
| - Vitamine E (µg.g ⁻¹ de tourteau) | | | | 248 ± 12 |
| α-tocophérol | | 3,3 – 7,2 | | 24 ± 7 |
| β-tocophérol | | | | ND |
| γ-tocophérol | | 65,4 – 338,0 | | 177 ± 8 |
| δ-tocophérol | | | | 3 ± 0 |
| α-tocophérol | | | | ND |
| γ-tocophérol | | | | 43 ± 2 |
| AG des lipides totaux (%) | | | | |
| 16:0 | 7,3 | 7,2 – 7,6 | 7,4 | |
| 18:0 | | 2,3 – 2,5 | 2,7 | |
| 18:1 (n-9) | 16,1 | 20,3 – 20,5 | 17,2 | |
| 18:2 (n-6) | 26,2 | 24,3 – 24,6 | 21,1 | |
| 18:3 (n-3) | 38,8 | 29,4 – 30,2 | 28,8 | |
| 20:0 | | | 1,4 | |
| 20:1 (n-9) | 11,6 | 11,2 – 13,3 | 15,3 | |
| 22:1 (n-9) | | | 1,7 | |
| 20:4 (n-6) | | | 2,5 | |

mat. : matière ; GAE : équivalent en acide gallique ; AG : acide gras.

I.1.2 Le lin (*Linum usitatissimum* L.)

Le lin, est une plante de la famille des linacées (Figure 3.2). On distingue le lin fibre utilisé en industrie textile pour sa teneur élevée en fibres et le lin oléagineux utilisé en alimentation animale et humaine. La graine de lin oléagineux contient environ 7% d'eau, 20% de protéines, 28% de glucides et plus de 34% de lipides (Tableau 3.2.A) (Daun et al., 2003 ; Gutiérrez et al., 2010 ; Mueller et al., 2010). La fraction lipidique de la graine est constituée de triglycérides, de diglycérides, de glycolipides et de monoglycérides (Tableau 3.2.A) (Daun et al., 2003). Les acides gras libres représentent 0,1 à 3,4% mass de la graine. La proportion de phospholipides varie de 0,1 à 2,3 g.100 g⁻¹ de graine (Daun et al., 2003) ou de 1,8 à 2,5% de lipides (Herchi et al., 2011). Les classes de phospholipides détectées dans la graine de lin sont : PC, PE, PI et PG (Daun et al., 2003 ; Herchi et al., 2011). Néanmoins, on observe des écarts significatifs des valeurs publiées liées aux techniques d'analyse : co-élution de PE et PS (Daun et al., 2003) ou détection de PA (Herchi et al., 2011) ou de cardiolipine, phospholipide caractéristique des membranes des mitochondries des cellules eucaryotes (Daun et al., 2003). Les lipides totaux de la graine de lin se caractérisent par leur teneur élevée en ALA (plus de 50% des AG) et une proportion faible en acides gras saturés (environ 9%).



Figure 3.2 : Fleurs et graines de lin.

Les lipides insaponifiables sont caractérisés par la famille des stérols représentée majoritairement par le β -sitostérol (45 à 53%) (Daun et al., 2003). La vitamine E est représentée principalement par les tocophérols (8,8 à 57,2 mg.100 g⁻¹ de graine) et le plastochromanol-8 (Daun et al., 2003). La graine de lin est une source alimentaire riche en lignanes avec la présence majoritaire du diglucoside secoisolariciresinol (SDG) (3 699 μ g.g⁻¹ de matière sèche) et de matairesinol (11 μ g.g⁻¹ de matière sèche) (Mazur and Adlercreutz, 1998). De plus, la graine de lin contient des composés phénoliques tels que l'acide p-coumarique et l'acide férulique, (Johnsson et al., 2002). La sinapine est identifiée dans la graine de lin. Les caroténoïdes quantifiés entre 8,0 et 46,1 mg.kg⁻¹ de graine sont représentés majoritairement par la lutéine (Daun et al., 2003). D'autres pigments sont aussi présents dans la graine de lin comme la chlorophylle (0,7 à 2,0 mg.kg⁻¹ de graine). Enfin, la graine de lin contient des anti-nutriments tels que (Daun et al., 2003) :

- l'acide phytique : chélateur de cations minéraux (potassium, magnésium, fer et zinc) et capable de se lier à l'amidon ou aux protéines ;
- les glycosides cyanogéniques ;
- la linatine : antagoniste de la vitamine B6 ;

- une activité inhibitrice de la trypsine (Daun et al., 2003 ; Quezada and Cherian, 2012).

L'huile de lin, tout comme la graine, est riche en acide α -linolénique, qui représente plus de 50% des acides gras totaux (Tableau 3.2.B). L'huile de lin est aussi riche en molécules antioxydantes sous forme de tocophérols (majoritairement la forme γ) et de plastochromanol-8 (Tableau 3.2.B). Des flavonoïdes et des chlorophylles peuvent être extraits par pression et quantifiés dans l'huile (Tableau 3.2.B). Depuis 2008, l'huile de lin employée dans un mélange alimentaire est autorisée pour la consommation humaine courante (avis Anses saisines 2004-SA-0213 et 2004-SA-0409). De plus, l'arrêté de juillet 2010 autorise la consommation de l'huile de lin vierge pure (décret NOR : ECEC0911344A du J.O. du 21 juillet 2010).

Le tourteau de lin est largement étudié comme l'atteste le nombre de publications portant dans le titre Flaxseed meal/cake ou Linseed meal/cake (139 publications, Scopus). Selon les conditions de trituration, le tourteau est plus ou moins déshuilé. Un tourteau issu du pressage à froid contient entre 3 et 30% de lipides (Tableau 3.2.C). La fraction lipidique du tourteau de lin est encore riche en AGPI n-3, bien qu'ils ne représentent plus que 39% des acides gras totaux, contre plus de 50% dans l'huile extraite. Cette fraction est aussi intéressante pour ses propriétés antioxydantes de par la présence de lignanes (20 mg équivalent SDG.g⁻¹ de tourteau) caractérisé par la présence majoritaire de SDG, de matairesinol et d'anhydrosecol (Meagher et al., 1999).

Tableau 3.2 : Principaux composés de la graine (A), de l'huile (B) et du tourteau de lin (C).

A : Composition lipidique de la graine de lin.

| | Daun et al., 2003 | Quezada and Cherian 2012 | Herchi et al., 2011 |
|--|-----------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| Lipides (%mass) | 34 – 45,6 (graine) | 42 (graine) | 34,8 – 36,6 (mat. sèche) |
| - Triglycérides (%mass de la graine) | 36,0 – 40,7 | | |
| - Diglycérides (%mass de la graine) | 0,9 – 2,6 | | |
| - Monoglycérides (%mass de la graine) | 0,5 – 0,9 | | |
| - Glycolipides (%mass de la graine) | 1,0 – 2,9 | | |
| - Phospholipides | 0,1 – 2,3%mass de la graine | | 1,8 – 2,5 % de lipides |
| PC | 29,1 – 67,5 | | 7,2 – 17,8 |
| PE+PS | 3,1 – 35,9 | | 27,4 – 40,4 |
| PI | 6,9 – 23,4 | | 29,3 – 31,7 |
| (%PL) PA | | | 0,9 – 8,6 |
| PG | 2,5 – 19,5 ^a | | 1,5 – 4,2 |
| LPC | | | 12,4 – 21,5 |
| CL | 19,5 – 20,3 | | |
| - Acide gras libres (%mass de la graine) | 0,1 – 3,4 | | |
| - Stérols libres/esters de stérol/hydrocarbones (%mass de la graine) | 0,5 – 2,9 | | |
| Cholestérol | 0 – 0,09 | | |
| Brassicastérol | 0,1 – 0,7 | | |
| Campestérol | 25 – 31 | | |
| Stigmastérol | 6 – 9 | | |
| (% stérols) β -sitostérol | 45 – 53 | | |
| Δ^5 - Avenastérol | 8 – 12 | | |
| Δ^7 - Avenastérol | 0 – 0,6 | | |
| Δ^7 - Stigmastérol | 0 – 3 | | |
| - Vitamine E (mg. 100 g ⁻¹ de graine) | 8,8 – 57,2 | | |
| α -tocophérol | 0,0 – 1,2 | | |
| (mg. 100 g ⁻¹ de graines) β -tocophérol | 2,4 | | |
| γ -tocophérol | 8,5 – 39,5 | | |
| δ -tocophérol | 0,2 – 1,1 | | |
| Plastochromanol – 8 | 11,9 – 13,9 | | |
| - Caroténoïdes : (mg.kg ⁻¹ de graines) | 8,0 – 46,1 | | |
| Lutéine (mg.kg ⁻¹ de graines) | 27,7 | | |
| - Chlorophylle (mg.kg ⁻¹ de graines) | 0,7 – 2,0 | | |

| | |
|---|-------|
| - Flavonoïdes | 1,7 |
| (mg éq quercétine.g ⁻¹ de graines) | |
| AG des lipides totaux (%) | |
| 16:0 | 5,81 |
| 16:1 | 0,22 |
| 18:0 | 3,47 |
| 18:1 (n-9) | 15,61 |
| 18:2 (n-6) | 14,52 |
| 18:3 (n-3) | 60,08 |
| 20:1 (n-9) | 0 |
| 20:2 (n-6) | 0,17 |
| 22:1 (n-9) | 0 |
| Autres | 0,11 |

^aQuantification de PG+LPG

mat. : matière ; PL : phospholipides ; (L)PC : (lyso-)phosphatidylcholine ; PI : phosphatidylinositol ; PE : phosphatidyléthanolamine ; PA : acide phosphatidique ; PS : phosphatidylsérine ; PG : phosphatidylglycérol ; CL : cardiolipine ; AG : acide gras ; éq. : équivalent.

B : Composition de l'huile de lin.

| | Budin et al., 1995 | Choo et al., 2007 | Gutiérrez et al., 2010 | Teh and Birch, 2013 |
|--|--------------------|-------------------|------------------------|---------------------|
| AG des lipides totaux (%) | | | | |
| 16:0 | 5,1 | 5,5 - 6,5 | 5,53 | 6,08 ± 0,13 |
| 16:1 | | 0,1 | 0,05 | |
| 18:0 | 4,6 | 2,2 - 4,1 | 5,12 | 2,73 ± 0,19 |
| 18:1 (n-9) | 24,3 | 13,4 - 22,2 | 20,98 | 15,20 ± 0,63 |
| 18:2 (n-6) | 16,3 | 15,2 - 17,4 | 16,34 | 16,66 ± 0,44 |
| 18:3 (n-6) | | - | - | - |
| 18:3 (n-3) | 45,1 | 51,8 - 60,4 | 51,86 | 59,34 ± 1,34 |
| 20:0 | | 0,1 - 0,2 | - | - |
| 20:1 (n-9) | 0 | 0,1 - 0,2 | - | - |
| 20:2 (n-6) | | >0,1 | - | - |
| 22:1 (n-9) | 0,9 | - | | - |
| Autres | 3,7 | >0,4 | | |
| - Tocophérols : | | 154 - 245 | | |
| (mg.100 g ⁻¹ d'huile) | | | | |
| α-tocophérol | | 0 - 91 | | - |
| γ-tocophérol | | 106 - 150 | | 37,00 ± 0,02 |
| - β-carotène | | | | |
| (mg.100 g ⁻¹ d'huile) | | | | 0,06 ± 0,00 |
| - Chlorophylle | | | | |
| (mg de phéophytine a.kg ⁻¹ huile) | | 0,8 - 5,8 | | 6,78 ± 0,01 |
| - Flavonoïdes | | | | |
| (mg de lutéoline. 100 g ⁻¹ huile) | | 12,7 - 25,6 | | |

AG : acide gras

C : Composition du tourteau de lin.

| | Quezada and Cherian, 2012 | Mueller et al., 2010 | Gutiérrez et al., 2010 | Ho et al., 2007 |
|---|------------------------------|-----------------------------|------------------------|--------------------------|
| Contenu en eau (%mass de tourteau) | | 8,6 - 12,6 | 10,7 | 5,8 ± 0,2 |
| Protéines (%mass) | | 36,9 - 40,9 (mat. sèche) | 27,8 (mat. sèche) | 33,3 ± 0,1 (tourteau) |
| Glucides (%mass) | | 44,5 - 45,3 (mat. sèche) | | 43,0 ± 0,2 (tourteau) |
| Fibre (%mass) | | | 7,0 (mat. sèche) | |
| Cendre (%mass) | | 6,2 – 6,3 (mat. sèche) | 3,4 (mat. sèche) | 5,5 ± 0,0 (tourteau) |
| Lipides (%mass) | 2,72 (tourteau) | 7,6 - 12,4 (mat. sèche) | 29,37 (mat. sèche) | 12,4 ± 0,1 (tourteau) |
| Lignanes (mg.g ⁻¹ de tourteau) | | | | 20,8 |
| AG des lipides totaux (%) : | | | | |
| 16:0 | 12,9 | | | |
| 18:0 | 3,7 | | | |
| 18:1 (n-9) | 23,3 | | | |
| 18:2 (n-6) | 18,7 | | | |
| 18:3 (n-3) | 39,3 | | | |
| 20:1 (n-9) | 0,5 | | | |
| 20:4 (n-6) | 0,7 | | | |
| Autres | 0,9 | | | |

mat. : matière ; AG : acide gras.

I.1.3 Le chanvre (*Cannabis sativa* L.)

Le chanvre est une plante de la famille des cannabacées (Figure 3.3). Elle est utilisée pour la fabrication de vêtements ou de papier. Le chanvre produit une molécule psychotrope, appelée δ-9-tétrahydrocannabinol (THC). A cause de la présence de cette molécule, la production de chanvre est très réglementée. Seules les variétés ne développant pas plus de 0,3% de THC dans les parties vertes de la plante sont cultivées en France.

La graine de chanvre a une teneur en protéines comprise entre 23 et 28% et un contenu en glucides de l'ordre de 28% (Tableau 3.3.A). Une teneur en lipides des graines allant jusqu'à 36% est reportée. Aucune donnée n'est publiée concernant le contenu en triglycérides et phospholipides de la graine de chanvre, tandis que la composition en acides gras est connue (Tableau 3.3.A), avec une forte majorité de l'acide linoléique (plus de 50% des acides gras totaux). Les lipides totaux se caractérisent aussi par un acide gras rarement présent dans les autres variétés d'oléagineux, l'acide γ-linolénique (environ 4%). Des composés phénoliques sont aussi présents dans la graine de chanvre et n'excèdent pas 6 mg équivalent en acide gallique .100 g⁻¹ de matière sèche. Les quatre types de tocophérol sont détectés, dont le majoritaire est le γ-tocophérol (97% des tocophérols). Enfin, du β-carotène est aussi quantifié (Tableau 3.3.A).



Figure 3.3 : Fleurs et graines de chanvre.

L'huile de chanvre extraite des graines se caractérise par la présence majoritaire d'acides gras polyinsaturés (environ 80% des AG totaux), dont les principaux représentants sont l'acide linoléique (57%) et l'acide α -linolénique (19%) (Tableau 3.3.B). On retrouve la présence d'acide γ -linolénique (environ 4%). L'huile de chanvre est intéressante par son contenu en antioxydants sous la forme principale de tocophérols notamment par une teneur élevée en γ -tocophérol. Le β -carotène est aussi quantifié dans l'huile de chanvre avec des valeurs pouvant atteindre $5,3 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ d'huile (Oomah et al., 2002). L'huile de chanvre contient aussi de la chlorophylle, molécule pro-oxydante par sa capacité à chélater des ions pro-oxydants, à hauteur de 75 mg équivalent de phéophytine $\text{a} \cdot \text{kg}^{-1}$ d'huile (Teh and Birch, 2013). Des molécules insaponifiables sont également quantifiées telles que les stérols : β -sitostérol, stérol majoritaire (68%), campestérol (15 à 18%), Δ^5 avenastérol (5 à 7%) et estigmastérol (4%) (Tableau 3.3.B). Le cholestérol est détecté dans des proportions très faibles (0,03 à 0,7%). Enfin, la présence de plusieurs terpènes dans l'huile de chanvre est confirmée, dont les plus abondants sont le β -carophyllène ($40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ d'huile) et le myrcène ($160 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ d'huile) (Leizer et al., 2000). La présence de ces molécules conférerait à l'huile de chanvre des propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes et une protection du système gastro-intestinal (Bonamin et al., 2014).

Il existe peu de données sur la composition lipidique du tourteau de chanvre (7 publications, mots clés dans le titre : hempseed cake, Scopus à comparer avec les 1 922 publications contenant dans le titre hemp, Scopus). Le tourteau de chanvre contient majoritairement des protéines (28 à 34%) et des fibres (17 à 43%). La partie lipidique représente à peine 12% du tourteau (Pojic et al., 2014 ; Callaway, 2010). Le profil en acides gras des lipides du tourteau est très semblable à celui de l'huile de chanvre (Tableau 3.3.C). Les lipides du tourteau contiennent aussi des molécules phénoliques, telles que la catéchine ($498 \pm 36 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ de matière sèche). Le tourteau de chanvre présente une activité inhibitrice de la trypsine ($2,88 \text{ TIU} \cdot \text{mg}^{-1}$ de protéines), contient de l'acide phytique et des glucosinolates ($3,8 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$) (Pojic et al., 2014), ce qui peut le rendre impropre à la consommation animale.

Tableau 3.3 : Principaux composés de la graine (A), de l'huile (B) et du tourteau de chanvre (C).

A : Composition en lipides de la graine de chanvre.

| | Oomah et al., 2002 | Vonapartis et al., 2015 | Callaway, 2010 |
|---|------------------------------------|--|----------------|
| Lipides : | | | |
| (%mass de mat. sèche) | | 26,9 - 30,6 | 36 |
| - Composés phénoliques | | | |
| (g GAE. 100 g ⁻¹ de matière sèche) | | 1,4 – 5,2 | |
| - Vitamine E : | | | |
| (mg. 100 g ⁻¹ de lipides) | 10,9 | | |
| α-tocophérol | 3,4 mg. 100 g ⁻¹ huile | | |
| β-tocophérol | 0,6 mg. 100 g ⁻¹ huile | | |
| γ-tocophérol | 73,3 mg. 100 g ⁻¹ huile | 2,1 – 2,9 mg.g ⁻¹ de mat. sèche | |
| δ-tocophérol | 2,5 mg. 100 g ⁻¹ huile | 0,6 – 1,2 mg.g ⁻¹ de mat. sèche | |
| - β-carotène | | | |
| (mg. 100 g ⁻¹ de lipides) | 2,0 – 2,8 | | |
| AG des lipides totaux (%) : | | | |
| 16:0 | 6,6 | 6,66 – 6,98 | |
| 18:0 | 2,7 | 2,08 – 2,82 | |
| 18:1 (n-9) | 10,1 | 9,38 – 13,00 | |
| 18:2 (n-6) | 54,3 | 55,56 – 56,58 | |
| 18:3 (n-6) | 3,6 | 2,56 – 4,49 | |
| 18:3 (n-3) | 19,1 | 14,69 – 17,27 | |
| 20:0 | 0,9 | 0,64 – 0,78 | |
| 20:2 (n-6) | 1,4 | 0,75 – 1,29 | |
| 22:1 (n-9) | | 1,31 – 2,55 | |
| 22:0 | 0,3 | | |

mat. : matière ; GAE : équivalent d'acide gallique ; AG : acide gras.

B : Composition de l'huile de chanvre.

| | Oomah et al., 2002 | Matthäus and Brühl, 2008 | Montserrat-de la Paz et al., 2014 | Teh and Birch, 2013 | Leizer et al., 2000 |
|--|-----------------------|--|--|------------------------|---|
| AG des lipides totaux | | | | | |
| (%) : | | | | | |
| 16:0 | 5,9 – 6,4 | | 5,62 ± 0,04 | 6,3 ± 0,2 | 5 – 7 |
| 16:1 | | | 0,31 ± 0,02 | | |
| 18:0 | 2,7 – 3,2 | | 2,68 ± 0,12 | 2,5 ± 0,2 | 1 – 2 |
| 18:1 (n-9) | 10,9 – 15,6 | | 11,90 ± 0,35 | 9,6 ± 0,2 | 8 – 13 |
| 18:2 (n-6) | 53,4 – 56,6 | | 55,05 ± 0,47 | 56,9 ± 0,2 | 52 – 62 |
| 18:3 (n-6) | 2,0 – 2,7 | | 3,40 ± 0,12 | 4,8 ± 0,1 | 3 – 4 |
| 18:3 (n-3) | 15,1 – 19,4 | | 16,70 ± 0,08 | 18,8 ± 0,8 | 12 – 23 |
| 20:0 | 0,8 – 1,0 | | 2,50 ± 0,15 | 0,9 ± 0,1 | 0,39 – 0,79 |
| 20:1 (n-9) | | | 1,44 ± 0,01 | 0,4 ± 0,2 | 0,51 |
| 20:2 (n-6) | 0,9 | | | | 0 |
| 22:0 | 0,3 – 0,4 | | 0,40 ± 0,03 | | |
| - Stérols totaux : | | 3,9 – 6,7 g.kg ⁻¹ de lipides | 2,8 ± 0,1 g.kg ⁻¹ de lipides | | 100 – 148 g éq. β-sitostérol.L ⁻¹ |
| Cholestérol | | 22 – 74 | 0,92 ± 0,03 | | |
| Campestérol | | 257 – 1 001 | 505,69 ± 32,04 | | |
| (mg.kg ⁻¹ Estigmastérol | | | 100,23 ± 7,47 | | |
| lipides) Stigmastérol | | 97 – 181 | | | |
| β-Sitostérol | | 2 704 – 4 434 | 1 905,07 ± 59,27 | | |
| Δ ⁵ -Avenastérol | | 209 – 572 | 142,80 ± 7,68 | | |
| - Vitamine E | | | | | |
| (mg.100 g ⁻¹ de lipides) | 13,5 – 13,6 | | | | |
| α-tocophérol | 5,2 – 6,3 | 6 | 3,22 ± 0,65 | 2,78 ± 0,01 | Tr. |
| (mg.100 g ⁻¹ β-tocophérol | 0,8 – 1,0 | Tr. | 0,81 ± 0,16 | | |
| de lipides) γ-tocophérol | 70,5 – 79,1 | 64 – 67 | 73,38 ± 2,86 | 56,41 ± 0,02 | 468 ^a |
| δ-tocophérol | 1,6 – 2,4 | 4 | 2,87 ± 0,83 | | |
| Plastochromanol-8 | | Tr. | | | |
| - Chlorophylle | | | | | |
| (mg éq. Phéophytine a.kg ⁻¹ | | | | 75,21 ± 0,04 | |
| lipides) | | | | | |
| - β-carotène | | | | | |
| (mg.100 g ⁻¹ de lipides) | 3,4 – 5,3 | | | | |

^a résultat exprimé en mg.L⁻¹.

AG : acide gras ; Tr. : trace.

C : Composition du tourteau de chanvre.

| | Pojić et al., 2014 | Callaway, 2010 |
|---|----------------------------|------------------|
| Contenu en eau (%mass) | 7,9 ± 0,1 | 5 |
| Protéines (%mass) | 27,9 ± 0,1 (mat. sèche) | 34 (tourteau) |
| Glucides (%mass) | 1,5 ± 0,1 (mat. sèche) | 43 (tourteau) |
| Fibre (%mass) | 17,3 ± 0,0 (mat. sèche) | |
| Cendre (%mass) | 6,7 ± 0,0 (mat. sèche) | 7 (tourteau) |
| Lipides (%mass) | 11,8 ± 0,0 (mat. sèche) | 11 (tourteau) |
| AG des lipides totaux (%mass) | | |
| 16:0 | 6,63 ± 0,0 | |
| 18:0 | 3,3 ± 0,0 | |
| 18:1 | 13,0 ± 0,5 | |
| 18:2 | 54,8 ± 0,3 | |
| 18:3 (n-3) | 18,4 ± 0,1 | |
| 18:3 (n-6) | 2,76 ± 0,0 | |
| 20:0 | 1,1 ± 0,0 | |

mat. : matière ; AG : acide gras.

I.1.4 Le sésame (*Sesamum indicum* L.)

Le sésame est une plante annuelle qui appartient à la famille des pédaliacées (Figure 3.4). Les graines de sésame sont utilisées entières dans des plats cuisinés (pains hamburger, croquants au sésame et tahiné), ou comme source d'huile dans les produits cosmétiques et l'agroalimentaire. La graine de sésame est composée de 47 à 56% de lipides, de 26% de protéines et de 19% de fibres (Tableau 3.4.A). La fraction lipidique de la graine de sésame se caractérise par :

- la présence majoritaire de triglycérides (89% des lipides) et une teneur en phospholipides inférieure ou égale à 3% des lipides (Abou-Gharbia et al., 2000 ; Kamal-Eldin and Appelqvist, 1994). La phosphatidylcholine est le principal phospholipide de la graine de sésame (> 50% des phospholipides) ;
- une teneur importante en LA (entre 35 et 42% des AG) et en acide oléique (41 à 45% des AG) ;
- la présence de stérols, représentés essentiellement par le β -sitostérol (50,6 à 54,4% des stérols), le campestérol (10,9 à 14,9%), le Δ^5 avenastérol (6,9 à 10,2%) et le stigmastérol (5,3 à 7,4%) (Kamal-Eldin and Appelqvist, 1994). D'autres stérols sont détectés dont notamment le cholestérol, mais dans des proportions très faibles (0,1 à 0,2%) ;

- la présence de deux types d'antioxydant : les tocophérols et les lignanes. La teneur des tocophérols est inférieure à 0,1% des lipides (Kamal-Eldin and Appelqvist, 1994) tandis que celle des lignanes qui représente environ 1% (Elleuch et al., 2007 ; Kamal-Eldin and Appelqvist, 1994). Les principaux lignanes trouvés dans la graine de sésame sont le sésamol (24 à 43% des lignanes), le sésamine (21 à 42% des lignanes) et le sésamoline (21 à 36% des lignanes) (Suja et al., 2005). D'autres lignanes sont aussi présents en faible quantité tels que le piperitol, sésamolinol et pinioresinol (Kanu et al., 2010).



Figure 3.4 : Fleurs et graines de sésame.

L'huile de sésame est riche en acide oléique (18:1 n-9) et en acide linoléique (18:2 n-6), comme dans la composition de la graine (Tableau 3.4.B). Par pressage, les stérols initialement présents dans la graine sont extraits (0,5 à 0,6% mass). Le β -sitostérol reste dans l'huile le principal stérol du sésame et correspond à plus de 59% des stérols (Crews et al., 2006). De même, les antioxydants sont extraits, dont les principaux représentants sont le γ -tocophérol (0,41 à 0,68% de lipides) (Crews et al., 2006), le sésamine et le sésamoline. Le sésamol présent dans la graine, n'est pas détecté dans l'huile (Suja et al., 2005).

Selon les techniques de pressage utilisées, le tourteau de sésame contient plus ou moins de lipides entre 30% (Mohdaly et al., 2010) et 52% (Suja et al., 2004) (Tableau 3.4.C). Les principales recherches sur le tourteau de sésame se consacrent aux antioxydants de type lignanes. D'autres composés phénoliques tels que les flavonoïdes ($0,41 \pm 0,02$ mg QE.g⁻¹ de poids sec), ont aussi été détectés (Mohdaly et al., 2010).

Tableau 3.4 : Principaux composés de la graine (A), de l'huile (B) et du tourteau de sésame (C).

A : Composition en lipides de la graine de sésame.

| | Kamal Eldin and Appelqvist, 1994 | Kamal Eldin and Appelqvist, 1994 | Abou-Gharbia et al., 2000 | Elleuch et al., 2007 |
|---|----------------------------------|----------------------------------|---------------------------|--|
| Lipides : (%mass) | 47,4 – 55,5 (graine) | | | 52,24 (mat. sèche) |
| - Triglycérides | 88,9%mass de lipides | | 97,6 ± 5,06% des LN | |
| - Diglycérides | 6,5%mass de lipides | | 1,0 ± 0,03% des LN | |
| - Monoglycérides | | | 1,2 ± 0,03% des LN | |
| - Phospholipides (%mass de lipides) | 2,8 | | 2,9 | |
| | PC | | 54,9 ± 3,1 | |
| | PE+PS | | 11,9 ± 0,6 | |
| (% PL) | PI | | 18,7 ± 0,6 | |
| | PA | | 13,7 ± 0,6 | |
| | LPC | | 0,7 ± 0,1 | |
| - Acide gras libre | 1,2%mass de lipides | | 0,2 ± 0,01% des LN | |
| - Stérols totaux (%mass de lipides) | 0,6 ^a | 0,51 – 0,76 | | |
| | Campestérol | 13,7 | | |
| | Stigmastérol | 7,3 | | |
| | Sitostérol | 59,6 | | |
| (% stérols) | Δ^5 Avenastérol | 8,4 | | |
| | Δ^7 Stigmastenol | 2,6 | | |
| | Δ^7 Avenastérol | 1,2 | | |
| | Autres | 7,2 | | |
| - Tocophérols : (mg.kg ⁻¹ de lipides) | | 490 – 680 | | |
| | α -tocophérol | 0,5 – 1,4 | | |
| (% tocophérols) | β -tocophérol | - | | |
| | γ -tocophérol | 97,0 – 97,6 | | |
| | δ -tocophérol | 1,6 – 2,4 | | |
| | Sésamine | | 0,55 ± 0,18 % lipides | |
| Lignanes : | Sésamoline | | 0,50 ± 0,09% lipides | |
| | Sésamol | | | 8,1 ± 0,7 mg.kg ⁻¹ lipides |
| AG des lipides totaux (%) : | | | | |
| 16:0 | 9,0 – 9,6 | | | 11,18 ± 0,76 |
| 16:1 | 0,1 – 0,2 | | | 0,21 ± 0,01 |
| 18:0 | 5,6 – 6,5 | | | 6,40 ± 0,17 |
| 18:1 (n-9) | 41,1 – 44,3 | | | 44,06 ± 0,58 |
| 18:2 (n-6) | 38,0 – 41,6 | | | 35,56 ± 0,07 |
| 18:3 (n-6) | | | | |

| | | |
|------------|-----------|-------------|
| 18:3 (n-3) | 0,5 – 0,6 | 0,50 ± 0,03 |
| 20:0 | 0,3 | 0,70 ± 0,04 |
| 20:1 | | 0,18 ± 0,01 |
| Autres | 0,8 – 0,9 | |

^a Esters de stérols quantifiés.

mat. : matière ; gr. : graine ; LN : lipides neutres ; PL : phospholipides ; (L)PC : (lyso-) phosphatidylcholine ; PI : phosphatidylinositol ; PE : phosphatidyléthanolamine ; PA : acide phosphatidique ; PS : phosphatidylsérine ; AG : acide gras ; tr. : trace.

B : Composition de l'huile de sésame.

| | Alimentarius, 1999 | Crews et al., 2006 | Park et al., 2010 | Suja et al., 2005 |
|------------------------------------|-----------------------------|--------------------|--------------------------|-------------------|
| AG des lipides totaux (%) : | | | | |
| 16:0 | 7,9 – 12,0 | 9,5 - 10,9 | 9,8 ± 0,2 | |
| 16:1 | ND – 0,2 | 0,1 - 0,2 | | |
| 18:0 | 4,5 – 6,7 | 5,0 - 6,6 | 6,3 ± 0,2 | |
| 18:1 (n-9) | 34,4 – 45,5 | 39,5 - 43,7 | 41,8 ± 0,9 | |
| 18:2 (n-6) | 36,9 – 47,9 | 38,8 - 43,9 | 40,5 ± 1,0 | |
| 18:3 (n-6) | | - | | |
| 18:3 (n-3) | 0,2 – 1,0 | 0,3 | 0,3 ± 0,0 | |
| 20:0 | 0,3 – 0,7 | 0,6 - 0,7 | 0,7 ± 0,0 | |
| 20:1 (n-9) | ND – 0,3 | 0,1 - 0,2 | | |
| 20:2 (n-6) | ND | | | |
| 22:1 (n-9) | ND | | | |
| Autres | | ≤ 0,2 | | |
| Stérols | | | | |
| (%mass de lipides) | 0,5 – 1,9 | 0,5 - 0,6 | | |
| (% stérols) | Campestérol | 10,1 – 20,0 | 15,2 - 17,7 ^a | |
| | Stigmastérol | 3,4 – 12,0 | 5,5 - 7,0 | |
| | β-Sitostérol | 57,7- 61,9 | 58,5 - 64,8 | |
| | Δ ⁵ Avenastérol | 6,2 – 7,8 | 8,7 - 12,6 | |
| | Δ ⁷ Stigmastenol | 0,5 – 7,6 | 0,4 - 0,7 | |
| | Δ ⁷ Avenastérol | 1,2 – 5,6 | 0,6 - 1,2 | |
| Tocophérols | | | | |
| (mg.kg ⁻¹ de lipides) | α-tocophérol | ND – 3,3 | ND | |
| | β-tocophérol | ND | ND | |
| | γ-tocophérol | 521 – 983 | 410 – 676 | |
| | δ-tocophérol | 4 – 21 | ND | |
| | α-tocotrienol | ND | ND | |
| | β-tocotrienol | | ND | |
| | γ-tocotrienol | ND - 20 | | |
| Lignanes (ppm huile) : | | | | |
| | Sésamine | | | 1154 – 4278 |
| | Sésamoline | | | 502 – 2740 |
| | Sésamol | | | Tr. |

^a composition prise pour une graine de sésame grillée

AG : acide gras ; Tr : trace ; ND : non détecté car à moins de 10 mg.kg⁻¹ d'huile.

C : Composition du tourteau de sésame.

| | Mohdaly et al., 2010 | Suja et al., 2005 | Ramachadran et al., 2007 | Suja et al., 2004 |
|--|-------------------------|-------------------|--------------------------|-------------------------|
| Contenu en eau (%mass) | 5,7 (tourteau) | | 16,8 | |
| Protéines (%mass) | 23,7 (matière sèche) | | 35,6 (tourteau) | 5,9 (matière sèche) |
| Glucides (%mass) | 28,8 (matière sèche) | | | 20,8 (matière sèche) |
| Lipides (%mass) | 30,3 (matière sèche) | | | 52,0 (matière sèche) |
| Fibre (%mass) | 10,9 (matière sèche) | | 7,6 (tourteau) | |
| Cendre (%mass) | 6,1 (matière sèche) | | 11,8 (tourteau) | 3,8 (matière sèche) |
| Lignane + lignane glucosides : (%mass) | | | | 15,4 (matière sèche) |
| Sésamol | | 2359 ± 12,3 | | 22,677 |
| (ppm de lipides) Sésamine | | 4431 ± 4,1 | | 105,893 |
| Sésamoline | | 939 ± 8,9 | | 12,504 |
| Sésaminole diglucoside | | | | 6 506 |
| Sésaminole triglucoside | | | | 6 792 |

I.1.5 La noix (*Juglans regia*)

La noix (Figure 3.5) est un fruit constitué majoritairement de lipides (> 60%) (Miraliakbari and Shahidi, 2008 ; Pereira et al., 2008 ; Venkatachalam and Sathe, 2006), le reste étant constitué de protéines (13 à 19%) et de glucides (moins de 10%). Les lipides de la noix sont constitués de triglycérides (espèce lipidique majoritaire), de phospholipides, de stérols, de vitamine E et d'autres composés phénoliques. La quantité de phospholipides est comprise entre 0,3 et 3% de lipides (Angelova-Romova et al., 2013 ; Miraliakbari and Shahidi, 2008). La présence de phosphatidylcholine, phosphatidylsérine, phosphatidylinositol et sphingomyéline est reportée dans la graine mais avec des proportions variables (Angelova-Romova et al., 2013 ; Miraliakbari and Shahidi, 2008) (Tableau 3.5.A). Les principaux acides gras présents dans la graine sont les AGPI (plus de 60% des AG) répartis entre le 18:2 (n-6) et le 18:3 (n-3). L'acide oléique représente entre 12 et 25% des AG. L'acide myristique (14:0) est quantifié dans un seul cas à hauteur de 14,4% des AG. Les stérols identifiés dans la noix (Tableau 3.5.A) sont le β -sitostérol représentant plus de 75% des stérols, le stigmastérol, le campestérol et le Δ^5 avenastérol (Bada et al., 2010 ; Miralickbari and Shahidi, 2008). Le cholestérol est aussi détecté et représente environ 3% des stérols. Le profil en vitamine E montre la présence des tocophérols α -, γ - et δ -tocophérols (Bada et al., 2010 ; Miralickbari and Shahidi, 2008). Le β -tocophérol n'est pas ou peu détecté (Tableau 3.5.A). Des molécules phénoliques antioxydantes sont aussi identifiées telles que l'acide ellagique (0,3 mg.g⁻¹ de noix ou 0,59 mg.g⁻¹ de matière sèche) (Haddad et al., 2014).



Figure 3.5 : Noyer et noix.

Les compositions en acides gras du fruit et de l'huile sont similaires. Les mêmes acides gras présents dans le fruit sont prépondérants dans l'huile de noix, tels que les acides linoléique (18:2 n-6) et α -linoléique (18:3 n-3) (Tableau 3.5.B). La teneur en α -linoléique supérieure à 5% classe cette huile comme une huile linolénique. L'huile contient aussi des tocophérols, dont le γ -tocophérol est le majoritaire.

Concernant le tourteau de noix, il est riche en protéines et en fibres et contient encore 10% de lipides (Tableau 3.5.C). L'acide linoléique est l'acide gras majoritaire des lipides du tourteau. Le tourteau de noix est aussi riche en composés phénoliques tels que le gallocatéchine ou l'épicatéchine. La présence de flavonoïdes et de terpènes (limonène) est détectée (Karaman et al., 2015).

Tableau 3.5 : Principaux composés du fruit (A), de l'huile (B) et du tourteau de noix (C).

A : Composition de la fraction lipidique de la noix.

| | Miraliakbari and Shahidi, 2008 | Angelova- Romova et al., 2013 | Pereira et al., 2008 | Gharibzahedi et al., 2013 | Venkatachalam and Sathe, 2006 | Bada et al., 2010 |
|---|--------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-------------------------------------|------------------------|
| Lipides : (%mass) | 72,5 ± 0,3 (fruit) | | 71,8 – 75,2 (mat. sèche) | 62,3 ± 2,1 (fruit) | 64,50 ± 0,45 (fruit) | 55,0 – 67,6 (fruit) |
| - Triglycérides (%mass de lipides) | 97,1 ± 0,1 | | | | | |
| - Phospholipides (%mass de lipides) | 3,1 | 0,3 – 0,4 | | | | |
| (% PL) | | | | | | |
| PC | 26 | 38,5 – 42,5 | | | | |
| PI | 16 | 23,4 – 28,9 | | | | |
| PE | | 12,5 – 17,9 | | | | |
| PA | | 5 – 10 | | | | |
| PS | 23 | 1 – 5 | | | | |
| LPC | | Tr. | | | | |
| Sphingolipide | 35 | 1 – 5 | | | | |
| - Stérols libres (%mass lipides) | 0,3 | | | | | |
| - Esters de stérols (%mass lipides) | 0,1 | | | | | |
| Cholestérol | 3,3 | | | | | 0,2 – 0,5 |
| Campestérol | 6,4 | | | | | 4,4 – 5,7 |
| Stigmastérol | 11,7 | | | | | 0,2 – 0,4 |
| β-Sitostérol | 75,3 | | | | | 78,6 – 86,5 |
| Δ ⁵ Avenastérol | 6,0 | | | | | 5,5 – 13,8 |
| - Vitamine E : | | | | | | |
| α-tocophérol | 38,0 ± 0,4 | | | 43 | | 11,6 – 26,3 |
| β-tocophérol | - | | | | | |
| γ-tocophérol | 375,8 ± 1,2 | | | 394 | | 289 – 676,5 |
| δ-tocophérol | 23,4 ± 0,4 | | | 26 | | 40,2 – 106,7 |
| AG des lipides totaux (%) : | | | | | | |
| 14:0 | 14,4 | | 0,02 – 0,04 | 0,4 ± 0,1 | 0,03 ± 0,00 | |
| 16:0 | 6,6 | | 6,0 – 6,6 | 8,8 ± 0,0 | 8,1 ± 0,1 | 6,1 – 7,4 |
| 16:1 | | | | 0,1 ± 0,0 | 0,1 ± 0,0 | 0,1 – 0,2 |
| 18:0 | 3,6 | | 2,7 – 3,1 | 3,1 ± 0,0 | 2,8 ± 0,0 | 1,5 – 2,8 |
| 18:1 (n-9) | 12,1 | | 14,9 – 20,2 | 25,1 ± 0,0 | 15,1 ± 0,1 | 11,7 – 19,7 |
| 18:2 (n-6) | 49,6 | | 55,5 – 60,3 | 50,1 ± 0,4 | 59,8 ± 0,0 | 59,8 – 64,7 |
| 18:3 (n-3) | 12,9 | | 13,2 – 17,6 | 12,0 ± 0,2 | 13,2 ± 0,0 | 11,1 – 15,7 |
| 20:0 | 0,0 | | 0,09 – 0,11 | | 0,1 ± 0,0 | |
| 20:1 (n-9) | 0,4 | | | 0,1 ± 0,0 | 0 | |
| 20:1 (n-6) | 0,0 | | | | | |
| 22:0 | | | 0,02 – 0,03 | | 0 | |

mat. : matière ; PL : phospholipides ; (L)PC : (lyso-) phosphatidylcholine ; PI : phosphatidylinositol ; PE : phosphatidyléthanolamine ; PA : acide phosphatidique ; PS : phosphatidylsérine ; AG : acide gras ; tr. : trace.

B : Composition de l'huile de noix.

| | ANSES 2013 | Gharibzahedi et al., 2013 | Christopoulos and Tsantili, 2015 |
|-----------------------|-------------|---------------------------|----------------------------------|
| AG des lipides | | | |
| totaux (%) : | | | |
| 14:0 | 0 | 0,4 ± 0,0 | 0,0 – 0,0 |
| 16:0 | 6,8 – 7,4 | 8,8 ± 0,0 | 6,6 – 8,3 |
| 16:1 | | 0,1 ± 0,0 | 0,05 – 0, |
| 18:0 | 2,0 | 3,0 ± 0,1 | 2,6 – 3,4 |
| 18:1 (n-9) | 15,2 – 22,2 | 24,2 ± 0,1 | 15,0 – 21,3 |
| 18:2 (n-6) | 52,9 – 59,0 | 50,1 ± 0,0 | 50,4 – 55,5 |
| 18:3 (n-6) | | | |
| 18:3 (n-3) | 9,7 – 13,0 | 12,0 ± 0,1 | 10,0 – 17,6 |
| 20:0 | | | 0,1 |
| 20:1 (n-11) | | | 0,7 – 0,8 |
| 20:1 (n-9) | | 0,2 ± 0,0 | |
| Vitamine E : | | | |
| <i>α</i> -tocophérol | | 43 | |
| <i>β</i> -tocophérol | | | |
| <i>γ</i> -tocophérol | | 343 | |
| <i>δ</i> -tocophérol | | 26 | |

AG : acide gras

C : Composition du tourteau de noix.

| | Karaman et al., 2015 | Haddad et al., 2014 |
|---|----------------------------|---|
| Contenu en eau (%mass mat. humide) | 9,45 | |
| Protéines (%mass) | 34,1 ± 1,0 (mat. sèche) | 15,2 (tourteau) |
| Glucides (%mass) | | 13,7 (tourteau) |
| Fibre (%mass) | 6,7 ± 0,2 (mat. sèche) | |
| Cendre (%mass) | 4,5 ± 0,2 (mat. sèche) | |
| Lipides : (%mass) | 10,1 ± 0,4 (mat. sèche) | 65,2 (tourteau) |
| - Phénol (mg GAE.100 g ⁻¹ tourteau) | 802 | 15,56 |
| <i>Gallicatéchine</i> | 1067,2 ± 64,5 ppm | |
| <i>Epicatéchine</i> | 689,0 ± 45,9 ppm | |
| <i>Catéchine</i> | 24,9 ± 2,2 ppm | 69,3 mg.100 g ⁻¹ tourteau |
| - Tocophérols : (mg.100 g ⁻¹ tourteau) | | |
| <i>α-tocophérol</i> | | 7 |
| <i>γ-tocophérol</i> | | 20,8 |
| AG des LT (%mass) | | |
| 16:0 | 7,8 ± 0,0 | |
| 18:0 | 4,0 ± 0,0 | |
| 18:1 | 20,1 ± 0,1 | |
| 18:2 | 57,3 ± 0,1 | |
| 18:3 (n-3) | 10,8 ± 0,0 | |
| 18:3 (n-6) | - | |
| 20:0 | - | |
| 20:1 (n-9) | - | |

mat. : matière ; GAE : équivalent en acide gallique ; AG : acide gras.

En conclusion, la comparaison des différentes valeurs de composition est délicate. Malgré cela, les cinq sources végétales présentées sont caractérisées par une teneur en lipides des graines ou du fruit élevée allant de 27% (chanvre) à plus de 70% (noix) qui permet de les classer de la manière suivante :

Chanvre < Cameline < Lin < Sésame < Noix

Les lipides sont majoritairement représentés par les triglycérides (90% et plus des lipides totaux). Les autres lipides sont des lipides saponifiables (di- et monoglycérides, phospholipides) ou insaponifiables (acides gras libres, stérols, vitamines liposolubles, composés phénoliques). Quand ils ont été quantifiés, les phospholipides représentent entre 0,1 et 3% des lipides totaux et sont généralement présents sous la forme de phosphatidylcholine, de phosphatidyléthanolamine et de phosphoinositol. Une minorité de lipides est constituée de stérols, dont au moins 50% de β -sitostérol. Les composés phénoliques recouvrent plusieurs familles de molécules comme les tocophérols, les

flavonoïdes et les lignanes. Dans l'ensemble des graines et du fruit étudiés, le tocophérol majoritaire est le γ -tocophérol (> 80% des tocophérols)

De ces graines et fruit oléagineux, des huiles de grade alimentaire sont extraites par pression. Comme toutes les huiles végétales, les acides gras caractéristiques des cinq sources présentées sont mono et polyinsaturés. Si on s'intéresse aux AGPI n-3 et notamment à l'acide α -linoléique en tant qu'acide gras indispensable et insuffisamment consommé dans l'alimentation actuelle, les cinq sources se classent de la manière suivante :

Sésame < Noix < Chanvre < Cameline < Lin

Certains composés mineurs identifiés dans la fraction lipidique de la graine sont extraits par pressage, comme les stérols ou les tocophérols. Néanmoins, la présence de ces composés ainsi que leur teneur dans l'huile sont fortement dépendantes des conditions de trituration appliquées.

L'extraction des lipides des graines n'est jamais totale, de sorte que les tourteaux contiennent encore entre 7 et 30% de lipides après pression. Peu de données existent sur la composition des tourteaux. Dans la mesure où les tourteaux sont généralement destinés à l'alimentation animale, les études se focalisent sur la teneur en protéines, sur la présence d'anti-nutriments et d'antioxydants. Dans ce cas, les tourteaux subissent une étape de déshuilage à l'hexane², afin de contenir une teneur en lipides aux environ de 2-3%. Néanmoins, le tourteau de lin peut aussi être utilisé en l'état (sans étape de déshuilage) pour une supplémentation des animaux en AGPI n-3 (Shim et al., 2015).

I.2 MISE AU POINT DES TECHNIQUES ANALYTIQUES

La caractérisation des différentes classes et espèces de lipides des sources végétales et animale a nécessité l'utilisation de techniques analytiques complémentaires. Les principales caractérisations réalisées ont porté sur :

- l'analyse de la composition en acides gras des lipides totaux et des phospholipides, afin de déterminer une ou plusieurs sources de PL riches en AGPI n-3. Les résultats obtenus permettent aussi de comparer les AG présents dans les LT et les PL ;
- la quantification des différentes familles de lipides des tourteaux. Ce paramètre est important dans l'objectif de valoriser les tourteaux en fonction de leur teneur en PL. Cette quantification est aussi déterminante pour l'analyse des fractions supercritiques. En effet, elle permet, d'une part, de s'assurer de la formation des liposomes et, d'autre part, de corréler la formulation des liposomes/éthosomes à leurs propriétés physico-chimiques. Par exemple, la présence d'antioxydants ou de stérols peut être un atout quant à leur stabilisation chimique ou jouer sur la fluidité de la bicouche phospholipidique.

² <http://www.prolea.com/?id=1591>

I.2.1 Analyse des acides gras des lipides totaux et des phospholipides

La chromatographie en phase gazeuse permet d'identifier et de quantifier les acides gras présents dans les lipides après une étape de méthylation (§.III.6.2_Chapitre 2). La RMN ^1H , quant à elle, permet de quantifier directement la proportion des AGPI n-3 totaux présents dans des échantillons de lipides totaux ou de phospholipides (§.III.6.1_Chapitre 2). Afin de déterminer la précision de chacune des techniques, un même mélange de phospholipides de composition connue en acides gras est analysé. Ce mélange est choisi pour représenter les phospholipides et AG présents dans les lipides des matrices végétales et animales qui seront à analyser : PA extrait de jaune d'œuf contenant entre autre du 18:1 (n-9) et du 18:2 (n-6), PC et PG contenant du 18:3 (n-3) et PE contenant du 22:6 (n-3). Les résultats obtenus par les deux méthodes d'analyse sont présentés dans le tableau 3.6.

Tableau 3.6 : Composition en acides gras d'un mélange de phospholipides de référence par CPG et RMN ^1H .

| AG présents dans le mélange de PL de référence ^a | Composition théorique en AG du mélange (%mol) | Composition en AG déterminé par CPG (%mol) | Composition en AG déterminé par RMN ^1H (%mol) |
|---|---|--|---|
| 16:0 | 8,9 | 8,1 | ND |
| 16:1 | 0,3 | 0,3 | ND |
| 18:0 | 2,7 | 2,9 | ND |
| 18:1 (n-9) | 7,5 | 6,2 | ND |
| 18:2 (n-6) | 4,4 | 3,4 | ND |
| 18:3 (n-3) | 53,4 | 52,2 | ND |
| 22:6 (n-3) | 22,8 | 26,9 | ND |
| Σ AGPI n-3 | 76,2 | 79,2 | 76,5 |

^aMélange de phospholipides : PA extrait de jaune d'œuf (23,1%mass), PG (25,6%mass), PC (25,6%mass) et PE (25,6%mass)

CPG : chromatographie en phase gazeuse ; ND : non déterminé ; RMN ^1H : résonance magnétique nucléaire du proton ; AGPI : acides gras polyinsaturés.

La RMN ^1H donne une quantification des AGPI n-3 de 76,5%mol, résultat à moins de 1% d'erreur de la valeur théorique et compris dans notre erreur expérimentale (pourcentage d'erreur sur la mesure est de 5%) Le résultat obtenu par la CPG est de 79,2%mol, résultat à moins de 4% d'erreur de la valeur théorique. Cet écart de 4% n'est pas significatif car inférieur à celui mesuré pour trois préparations d'esters méthyliques d'un même échantillon (pourcentage d'erreur de 9%). Ainsi, les deux techniques donnent une quantification cohérente des AGPI n-3 contenus dans un échantillon modèle.

Bien qu'aucune différence significative dans la quantification des AGPI n-3 ne soit observée entre les deux techniques, les valeurs obtenues par CPG sont légèrement supérieures à celles de la RMN ^1H . Ce phénomène est aussi observé sur les échantillons plus complexes analysés dans le cadre de ce projet (§ I.3.2_Chapitre 3) ou dans la littérature (Igarashi et al., 2000). Dans ce dernier cas, les

auteurs imputent cette différence à un temps de répétition trop court pour la RMN ^1H (8,5 s) pour permettre une quantification correcte des AGPI n-3. Dans nos analyses, ce paramètre ne peut expliquer cette différence car nous avons des temps de répétition suffisamment longs (13 s). Une autre explication peut provenir de l'expression des résultats. La RMN ^1H fournit un résultat exprimé en pourcentage molaire. La méthode de quantification des AG par CPG utilisant un détecteur à ionisation de flamme conduit à une proportion des AG en pourcentage massique. Pour comparer les résultats avec ceux de RMN, la conversion en pourcentage molaire se fait en considérant la masse molaire de chacun des acides gras identifiés dans l'échantillon.

En conclusion, si l'objectif de la mesure est de connaître la proportion des AGPI n-3 totaux, la RMN ^1H apparaît être la technique la plus adéquate, par sa précision et sa rapidité. En effet, en termes de temps d'analyse, la CPG est une méthode plus longue (90 minutes de temps d'acquisition) surtout si le temps de préparation des EMAG (120 min environ) est pris en compte. L'analyse par RMN ^1H ne demande aucune préparation préalable de l'échantillon et le temps d'acquisition d'un spectre est de seulement 1,5 min. Elle peut donc être utilisée pour un screening de matrices. S'il est nécessaire de connaître de manière précise la composition en acides gras des échantillons, alors la CPG est la méthode pertinente.

I.2.2 Quantification des classes de lipides par LC-DEDL

L'identification des classes de lipides est réalisée par LC-DEDL (§.III.5_Chapitre 2). A partir de cette technique d'analyse, il est possible d'identifier la présence de différentes familles de lipides (mono-, di- et triglycérides, esters de stérols, phospholipides). Cependant, la quantification ne peut être réalisée que sur les lipides neutres et acides gras libres. En effet, la colonne utilisée (colonne silice) n'est pas adaptée pour une étude approfondie des phospholipides, à cause des co-élutions possibles.

La quantification des lipides non phosphorés n'est pas aisée. Pour certains lipides saponifiables, le temps de rétention des pics peut varier suivant la composition en acides gras et leur position sur le squelette glycérol. Dans le cas de la quantification des TAG, la mise au point s'est faite sur le choix des standards à utiliser. Des essais sont d'abord réalisés à partir d'un mélange de TAG de longueur de chaînes variées (16:0, 18:0 et 20:0), choix basé sur la composition en AG des échantillons lipidiques, dans le but d'avoir une géométrie de pic équivalente aux échantillons à analyser. Cependant, les pics présentent encore des recouvrements. Pour éviter un traitement de déconvolution des pics, le gradient de solvants est amélioré. Ainsi, grâce au gradient d'élution adapté, un seul standard de TAG (TAG 18:0) s'est révélé suffisant pour la quantification des lipides des échantillons, quelle que soit la matrice végétale considérée. Néanmoins, l'amélioration du protocole d'élution ne permet pas d'éviter les épaulements du pic caractéristique des diglycérides, dus à la position des acides gras sur le glycérol (sn-1/sn-2 ou sn-1/sn-3) en entraînant un allongement du temps de rétention.

I.2.3 Quantification des classes de phospholipides

Les différentes classes de phospholipides peuvent être identifiées et quantifiées par de nombreuses méthodes d'analyse (RMN ^{31}P , spectrométrie de masse, CCM, LC-DEDL, etc...).

Les chromatogrammes obtenus par LC-DEDL indiquent, pour chaque tourteau, la présence de quatre espèces de phospholipides : PE, PA, PI et PC (Figure 3.6). Cependant, cette méthode n'est pas optimisée pour une analyse complète des phospholipides, car des co-élutions existent :

- PA est co-élué avec PG ;
- PI est co-élué avec la cardiolipine ;
- PS est co-éluée avec LPE.

L'analyse shotgun a mis en évidence un effet de la matrice dû à la nature des échantillons, rendant la quantification des phospholipides incertaine (§.III.4.3.2_Chapitre 2). De plus, les espèces isobares (molécules possédant des isotopes pratiquement de même masse) ne peuvent être assignées puisque l'analyse est faite à l'aide d'un spectromètre de masse quadripolaire, de résolution et précision relativement faible, ce qui entraîne des identifications erronées et des quantifications relatives fausses (Buré et al., 2013).

C'est pourquoi, dans cette étude, seules la RMN ^{31}P (§.III.4.2.2_Chapitre 2) et différentes méthodes de spectrométrie de masse sont utilisées dans l'identification des classes de phospholipides : LC-MS/MS en phase normale et phase inverse (§.III.4.3.3 et §.III.4.3.4_Chapitre 2). La complexité des mélanges de PL à analyser ainsi que le panel des méthodes à disposition ont conduit à passer au préalable par une phase d'étude comparative sur un mélange de PL de composition connue. Le tableau 3.7 présente les résultats obtenus pour 12 mélanges de trois PL quantifiés par RMN ^{31}P , LC-MS phase normale et phase inverse. La quantification des classes de phospholipides par RMN ^{31}P , obtenue par déconvolution des spectres, est la plus proche des valeurs attendues. Cependant, la RMN ^{31}P reste limitée pour les échantillons contenant du PA extrait du tourteau de cameline Bioplanète (échantillons 1, 6 et 10). En effet, dans ce cas, il est difficile de discriminer le pic caractéristique du PA et celui du PE. Ce résultat pourrait s'expliquer par :

- PA correspondant à un mélange d'espèces moléculaires, le mélange de différentes chaînes d'acides gras sur le squelette glycérol pourrait influencer l'environnement électronique du phosphore ;
- la présence de cations et l'acidité du milieu dues au protocole d'extraction du PA (extraction d'une plaque de CCM avec support silice, utilisation d'une solution de chlorure de potassium) peut entraîner une dégradation de la résolution. La quantité d'EDTA utilisée lors de l'analyse RMN n'est peut-être pas suffisante pour chélater l'ensemble des ions qui perturbent le signal. Cette hypothèse n'est valable que dans le cas de cette étude préliminaire qui a utilisé un PA purifié par CCM. Dans le cas des tourteaux, l'identification et la quantification des classes de PL seront effectuées à partir d'extraits de lipides totaux.

Afin d'améliorer la quantification de PE dans les trois échantillons contenant du PA extrait de tourteau de cameline, l'analyse du spectre proton a été nécessaire par l'exploitation des pics caractéristiques du CH₂ en position β du groupement phosphate de la PE ou de la PC.

En conclusion, les résultats de RMN sont en meilleure adéquation que ceux de LC par rapport aux résultats attendus. Ceci reflète le fait que toutes les espèces résonnent de la même manière. Il peut y avoir un élargissement de pic (perte de la résolution), mais cela ne joue pas sur la quantification sous condition que les paramètres d'acquisition soient définis correctement (temps de relaxation suffisamment long et couplage avec la RMN ¹H).

On peut noter que la RMN ³¹P donne des informations en pourcentage molaire, tandis que la spectrométrie de masse donne des résultats en pourcentage massique. Dans le cas présenté ici, la conversion est possible car la masse molaire des différents phospholipides modèles est connue. Pour le PA extrait du tourteau de cameline Bioplanète, sa masse molaire est déterminée par la technique MS.

Tableau 3.7 : Analyse de 12 mélanges de phospholipides par RMN ³¹P, HPLC-MS en phase normale et phase inverse.

| N° | %mol PA | | | | %mol PE 18:3 | | | | %mol PC 18:3 | | | |
|-------------------------|-----------|-------------------------|----------------------|----------------------|--------------|-------------------------|----------------------|----------------------|--------------|-------------------------|----------------------|----------------------|
| | Théorique | RMN ³¹ P | HPLC-MS (normale) | HPLC-MS (inverse) | Théorique | RMN ³¹ P | HPLC-MS (normale) | HPLC-MS (inverse) | Théorique | RMN ³¹ P | HPLC-MS (normale) | HPLC-MS (inverse) |
| 1^(a) | 16,5 | 14^(b) | 25,7 | 12 | 30,5 | 34^(b) | 23,3 | 54 | 52,9 | 52^(b) | 51,0 | 34 |
| 2 | 16,0 | | 36,9 | 9 | 55,4 | | 35,0 | 73 | 28,6 | | 28,1 | 18 |
| 3 | 32,0 | 37 | 49,3 | 47 | 20,2 | 17 | 13,2 | 21 | 47,8 | 46 | 37,5 | 32 |
| 4 | 51,9 | 49 | 67,4 | 50 | 29,5 | 30 | 16,8 | 33 | 18,6 | 21 | 15,8 | 17 |
| 5 | 42,3 | 42 | 56,8 | 31 | 15,0 | 14 | 9,6 | 25 | 42,6 | 44 | 33,6 | 44 |
| 6^(a) | 42,2 | 52 | 53,0 | 24 | 43,9 | 32 | 31,9 | 62 | 13,8 | 16 | 15,1 | 14 |
| 7 | 52,2 | 50 | 38,4 | 60 | 19,8 | 21 | 23,1 | 19 | 28,0 | 29 | 38,5 | 22 |
| 8 | 0,0 | 0 | ND | 0 | 51,4 | 51,5 | 51,4 | 65 | 48,6 | 48,5 | 48,6 | 35 |
| 9 | 62,1 | 60 | 74,2 | 72 | 14,7 | 15 | 8,3 | 13 | 23,2 | 25 | 17,5 | 15 |
| 10^(a) | 32,0 | 23 | 41,6 | 24 | 49,3 | 54 | 36,8 | 57 | 18,7 | 23 | 21,6 | 19 |
| 11 | 100,0 | 100 | 100,0 | 100 | 0,0 | 0 | ND | 0 | 0,0 | 0 | ND | 0 |
| 12 | 61,8 | 57 | 74,8 | 32 | 24,4 | 25 | 13,7 | 53 | 13,8 | 18 | 11,5 | 15 |

^a PA extrait des LT du tourteau de Cameline. Les autres échantillons contiennent du PA extrait d'œuf ;

^b Résultats en gras sont compris dans l'intervalle $\pm 15\%$ d'erreur par rapport à la valeur théorique.

ND : non détecté ; PA : acide phosphatidique ; PE : phosphatidyléthanolamine ; PC : phosphatidylcholine ; RMN : résonance magnétique nucléaire ; HPLC-MS : chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse.

Ainsi, la RMN ^{31}P est retenue pour l'analyse des classes de phospholipides des lipides totaux des matrices et des fractions supercritiques. Cependant, bien que moins précise pour des échantillons contenant du PA, la LC permet de lever les incertitudes d'identification de PL pouvant être utilisées pour préciser certaines attributions dans les spectres RMN. Les deux techniques de spectrométrie de masse gardent toute leur pertinence pour l'identification des espèces de phospholipides.

I.3 CARACTERISATION DES LIPIDES TOTAUX DES SOURCES VÉGÉTALES

I.3.1 Teneur en lipides totaux

Les tourteaux végétaux utilisés contiennent entre 5 et 9% d'eau (Tableau 3.8). Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature (moins de 12%) (Tableau 3.1.C, 3.2.C, 3.3.C, 3.4.C et 3.5.C).

Le tableau 3.8 présente la teneur en lipides totaux des différents tourteaux, extraits par la méthode de Folch. Les résultats sont exprimés par rapport à la matière sèche de manière à pouvoir être comparés. La teneur en LT des six tourteaux varie entre 9 et 26% mass de matière sèche. D'après les données bibliographiques sur la teneur en lipides totaux des graines et de la noix (Tableau 3.1.A, 3.2.A, 3.3.A, 3.4.A et 3.5.A), il est possible d'estimer un pourcentage d'huile extraite des tourteaux lors de l'étape de pression (Tableau 3.8). Les rendements d'extraction sont compris entre 50 et 88%, de sorte qu'il reste toujours une quantité non négligeable de lipides dans les tourteaux. Au niveau industriel, le déshuilage partiel des tourteaux peut correspondre soit à une rétention de l'huile dans la matrice végétale du fait d'une accessibilité réduite (coque de la graine, par exemple), soit à des conditions d'extraction peu poussées pour ne pas entraîner de molécules indésirables ou favoriser des phénomènes d'oxydation. De manière générale, les tourteaux gras subissent ensuite un déshuilage à l'hexane avant d'être utilisés en alimentation animale. Néanmoins, la fraction lipidique résiduelle des tourteaux pourrait être valorisée par l'extraction de molécules à plus forte valeur ajoutée qui pourraient intéresser différentes industries comme, la pharmacie, la nutrition ou l'agroalimentaire (phospholipides, molécules phénoliques, vitamine E).

Tableau 3.8 : Rendement d'extraction des lipides totaux des graines et de la noix.

| Matrice | Cameline | Cameline | Lin | Chanvre | Sésame | Noix |
|---|--------------|---------------|---------------|--------------|--------------|-------------|
| Fournisseur | Bioplanète | Iterg | Bioplanète | Bioplanète | Bioplanète | Bioplanète |
| Teneur en eau (%mass de mat. humide) | 9,3 | 5,3 | 8,2 | 6,2 | 7,6 | 5,4 |
| Teneur en LT ^{1,2} (%mass de mat. sèche) | 12,4 ± 1,0 b | 10,7 ± 1,7 bc | 11,8 ± 1,3 bc | 12,1 ± 2,2 b | 25,9 ± 3,6 a | 8,9 ± 1,2 c |
| Teneur moyenne en LT des graines ou fruits (%mass de mat. sèche) ³ | 40 | 40 | 40 | 31 | 52 | 73 |
| Rendement d'extraction des LT | 69% | 73% | 71% | 61% | 50% | 88% |

¹ Les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes suivant le test HSD de Tukey au seuil de significativité de 95%.

² Le nombre d'extractions indépendantes réalisées est ≥ 4.

³ Données de la littérature

LT : lipides totaux ; mat. : matière.

I.3.2 Composition en acides gras des lipides totaux

Le tableau 3.9 présente la quantification des AGPI n-3 des lipides totaux par RMN ¹H. Le tourteau de lin a la teneur en AGPI n-3 la plus importante, tandis que le tourteau de sésame contient une quantité d'AGPI n-3 non détectable. Le classement des tourteaux par leur teneur en AGPI n-3 est le suivant :

Sésame < Noix < Chanvre < Cameline Bioplanète et Iterg < Lin

Tableau 3.9 : Quantification des acides gras polyinsaturés n-3 des lipides totaux des tourteaux par RMN ¹H.

| (%mol) ^a | Cameline Bioplanète | Cameline Iterg | Lin | Chanvre | Sésame | Noix |
|-----------------------------------|------------------------|-------------------|-------------|-------------|-----------------|-----------|
| Σ AGPI n-3 ^b (%mol) | 29,9 - 30,3 | 25,0 - 30,5 | 42,8 - 44,3 | 10,6 - 12,3 | ND ^c | 8,5 - 9,9 |

^a Erreur sur la mesure de 7% max

^b Σ AGPI n-3 : somme des acides gras polyinsaturés de la série n-3.

^c ND : non détecté.

Le détail de la composition en acides gras est obtenu par l'analyse en CPG (Tableau 3.10). Dans l'ensemble des tourteaux étudiés, les AGPI sont les acides gras majoritaires estérifiés sur les lipides totaux (45,8 à 71,6%mass). Le sésame présente le plus faible taux d'AGPI, compensé par un taux élevé d'AGMI. Les principaux AGPI sont respectivement le LA (18:2 n-6) et l'ALA (18:3 n-3). Le principal AGMI est représenté par l'acide oléique (18:1). Les lipides totaux extraits des tourteaux de

noix et de chanvre sont composés à plus de 70%mass de LA (85% et 78% des AGPI, respectivement dans le tourteau de noix et de chanvre). Dans le cas du tourteau de chanvre, la présence d'un acide gras particulier est à noter : l'acide γ -linolénique (18:3 n-6) à hauteur de 2%. Les tourteaux de lin et de cameline contiennent les plus fortes teneurs en ALA, représentant, respectivement 68% et 39% environ des AGPI totaux. De ce fait, ces deux tourteaux sont caractérisés par un rapport AGPI n-6/n-3 inférieur à 1. Les lipides totaux des deux tourteaux de cameline se caractérisent aussi par une teneur élevée en acides gras comportant au moins 20 atomes de carbone. Ils représentent entre 19 et 21% des acides gras totaux. Il s'agit de l'acide 11-éicosénoïque (20:1) et de l'acide érucique (22:1), qui représente néanmoins moins de 5% des AG, seuil maximal autorisé par l'Union Européenne dans le cadre d'une utilisation dans l'alimentation.

Tableau 3.10 : Composition en acides gras des lipides totaux des tourteaux végétaux déterminée par CPG.

| Composition en AG ^a (%mass) | Cameline ^b <i>Bioplanète</i> | Cameline <i>Iterg</i> | Lin | Chanvre | Sésame | Noix |
|---|--|--------------------------|------|---------|--------|------|
| 16:0 | 7,2 - 7,5 | 7,8 | 7,1 | 8,2 | 8,3 | 8,2 |
| 18:0 | 2,1 - 2,2 | 2,8 | 3,6 | 3,4 | 5,8 | 3,1 |
| 18:1 (n-9) | 13,8 - 13,9 | 12,5 | 18,7 | 15,1 | 38,6 | 15,7 |
| 18:1 (n-7) | 1,1 | 1,1 | 0,8 | 0,9 | 0,7 | 0,8 |
| 18:2 (n-6) | 21,2 - 22,0 | 23,0 | 22,1 | 55,4 | 44,5 | 61,0 |
| 18:3 (n-6) | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,8 | 0,0 | 0,0 |
| 18:3 (n-3) | 33,3 - 34,2 | 32,2 | 46,8 | 13,1 | 0,4 | 10,3 |
| 20:0 | 1,1 - 1,2 | 1,4 | 0,2 | 0,9 | 0,5 | 0,1 |
| 20:1 (n-9) | 10,8 - 11,8 | 11,9 | 0,1 | 0,4 | 0,2 | 0,2 |
| 20:1 (n-7) | 1,0 - 1,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 20:3 (n-6) | 1,6 - 1,8 | 2,2 | 0,0 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| 21:0 | 1,2 | 1,3 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 22:1 (n-9) | 2,2 - 2,6 | 2,4 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| Autres^c | 1,3 - 1,5 | 1,6 | 0,6 | 0,7 | 1,1 | 0,5 |
| Σ AGS | 12,2 - 12,4 | 13,7 | 11,2 | 12,9 | 14,7 | 11,6 |
| Σ AGMI | 29,7 - 31,4 | 28,7 | 19,7 | 16,6 | 39,5 | 16,7 |
| Σ AGPI | 56,2 - 58,1 | 57,6 | 69,1 | 70,6 | 45,8 | 71,6 |
| Σ AGPI n-6 | 22,9 - 23,8 | 25,5 | 22,3 | 57,5 | 45,4 | 61,3 |
| Σ AGPI n-3 | 33,3 - 34,2 | 32,2 | 46,8 | 13,1 | 0,4 | 10,3 |

^a Un pourcentage d'erreur sur la préparation et la mesure de 9%mass est estimée

^b Deux extractions de lipides totaux et préparations d'EMAG indépendantes.

^c Les acides gras présents à moins de 1% sont répertoriés dans la catégorie « Autres ».

AG : acides gras ; AGS : acides gras saturés ; AGMI : acides gras monoinsaturés ; AGPI : acides gras polyinsaturés.

De manière générale, la composition en acides gras des huiles extraites des graines et fruit (Tableaux 3.1.B, 3.2.B, 3.3.B, 3.4.B et 3.5.B) est similaire à celle des lipides totaux des tourteaux (Tableau 3.10). Ceci suggère que la majorité des lipides totaux présents dans les tourteaux sont représentés par des triglycérides ce qui est démontré dans le § 1.3.3 (Chapitre 3). En revanche, on note des écarts relatifs plus importants (jusqu'à 80%) entre nos résultats et les compositions en AG

des tourteaux données dans la littérature (Tableau 3.1.C, 3.2.C, 3.3.C, 3.5.C). Ces écarts peuvent être liés à :

- une variabilité dans la nature des graines ou fruit utilisés (lieu de la culture, les conditions climatiques ou la variété végétale) ;
- une différence dans les procédés et conditions technologiques d'extraction de l'huile ;
- des techniques d'extraction différentes des lipides totaux des tourteaux (soxhlet dans de nombreux cas de la littérature (Karaman et al., 2015 ; Pojić et al., 2014) et extraction par la méthode Folch dans notre cas) ;
- la précision des analyses de CPG (colonne utilisée, programme de température ...).

I.3.3 Quantification des classes de lipides neutres et des acides gras libres

Les différentes classes de lipides présentes dans les lipides totaux des tourteaux sont séparées par chromatographie liquide et analysées par DEDL. La figure 3.6 présente les chromatogrammes obtenus pour les différents tourteaux. Cette technique permet uniquement la quantification des lipides neutres (TAG, DAG, MAG et esters de stérol totaux) et des acides gras libres (Tableau 3.11). La quantification des PL fait l'objet du § I.3.4.1 (Chapitre 3).

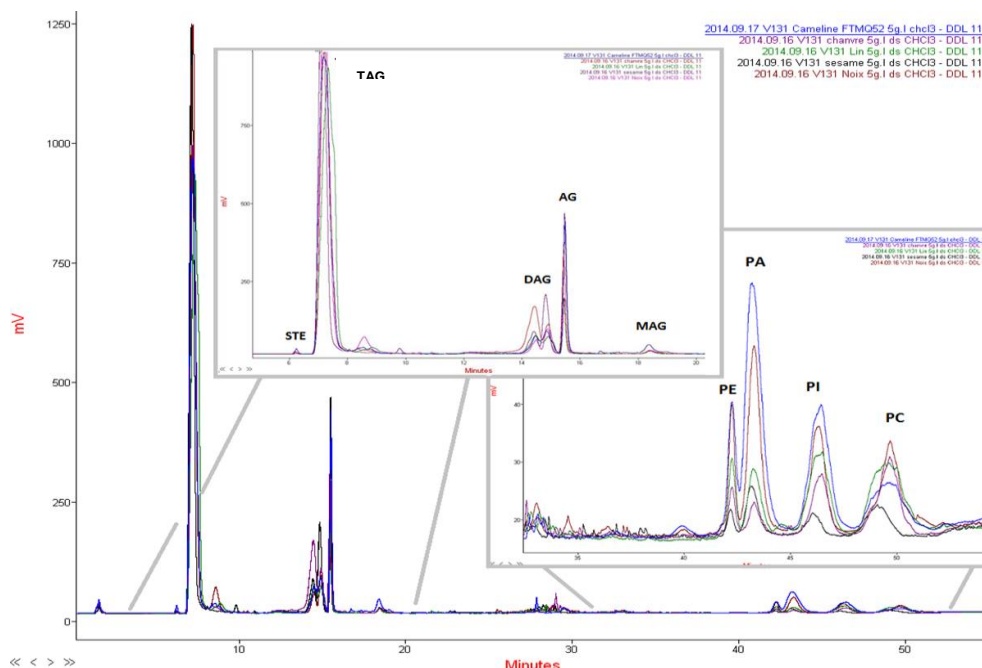


Figure 3.6 : Chromatogrammes des lipides totaux des cinq tourteaux Bioplanète obtenus par LC-DEDL.

STE : esters de stérols ; *TAG* : triglycérides ; *DAG* : diglycérides ; *AG* : acides gras libres ; *MAG* : monoglycérides ; *PE* : phosphatidyléthanolamine ; *PA* : acide phosphatidique ; *PI* : phosphatidylinositol ; *PC* : phosphatidylcholine.

Tableau 3.11 : Identification des lipides des tourteaux végétaux par LC-DEDL et LC-MS^a.

| Lipides (g. 100 g ⁻¹ de LT) | Cameline <i>Bioplanète</i> | Lin | Matrice Chanvre | Sésame | Noix |
|---|-------------------------------|-------------|--------------------|-------------|-------------|
| Triglycérides | 72,2 – 79,7 | 76,1 – 79,6 | 66,4 – 70,2 | 76,3 – 79,4 | 75,0 – 82,1 |
| Diglycérides | 3,1 – 3,3 | 3,1 – 3,2 | 7,8 – 8,0 | 6,1 – 6,6 | 2,0 – 2,52 |
| Monoglycérides | 7,5 – 11,4 | 10,4 – 11,9 | 6,6 – 10,1 | 7,8 – 11,4 | 8,3 – 10,3 |
| Acides gras libres | 10,7 – 12,5 | 3,3 – 4,9 | 6,6 – 8,6 | 11,6 – 14,5 | 2,5 – 4,6 |
| Esters de stérol : | 1,5 – 1,8 | 0,8 – 1,0 | 0,6 – 0,9 | 0,5 – 0,8 | 0,3 – 0,7 |
| <i>Cholestérol</i> | 11 | 6 | 6 | 4 | 14 |
| <i>Brassicastérol</i> | 5 | 5 | 1 | 4 | 0 |
| <i>Campestérol</i> | 24 | 23 | 13 | 21 | 4 |
| <i>Campestanol</i> | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| <i>Avenastérol/Stigmastérol</i> | 9 | 18 | 8 | 19 | 9 |
| <i>Sitostérol</i> | 48 | 45 | 68 | 48 | 70 |
| <i>Sitostanol</i> | 2 | 2 | 3 | 2 | 3 |

^a Deux mesures effectuées à partir de deux préparations différentes d'un même échantillon de lipides totaux.

LT : lipides totaux ; EST : ester de stérol.

Les triglycérides sont la famille lipidique majoritaire dans les lipides totaux des tourteaux oléagineux étudiés, tout comme dans les graines ou la noix. Ils composent 66 à 82% de la fraction lipidique du tourteau (Tableau 3.11). Les quantités des diglycérides, monoglycérides et acides gras libres sont plus variables suivant les tourteaux, de 13 à 32% des lipides. De manière générale, les AGL proviennent de l'hydrolyse enzymatique des TAG dans les graines et fruits (au niveau du stockage) et/ou dans les tourteaux (si les lipases n'ont pas été altérées par le procédé d'extraction) ou de la dégradation chimique des LT au cours de la trituration ou après extraction (hydrolyse chimique ou produits secondaires d'oxydation). Dans la mesure où les lipides totaux extraits sont aussitôt conservés au froid et à l'obscurité, leur dégradation au cours du stockage peut être négligée. Dans le cas du sésame, la forte proportion d'acides gras libres (> à 14%) peut être attribuée au traitement préalable des graines (grillées avant pressage). En effet, il a été montré que ce procédé conduit à une augmentation des AGL dans les lipides totaux par hydrolyse et donc aussi accompagnée d'une augmentation modérée des monoglycérides (Abou-Gharbia et al., 2000). La famille des esters de stérol (EST) représente moins de 1% des lipides du tourteau de lin, chanvre, sésame et noix et moins de 2% pour le tourteau de cameline. Il n'est pas possible de comparer ces valeurs avec celles de la littérature car les études reportent une teneur en stérols totaux sans faire la distinction entre forme libre et forme estérifiée. Les acides gras présents dans chacune de ces classes de lipides sont présentés en Annexe 4.

I.3.4 CARACTERISATION DES PHOSPHOLIPIDES

I.3.4.1 Quantification des phospholipides

La quantification des PL est réalisée selon deux méthodes d'analyse : la RMN ^{31}P et le dosage colorimétrique de Ames. La RMN est une technique de détection non destructive qui demande peu de temps de préparation de l'échantillon et un temps d'acquisition plus ou moins long (1 h à une nuit). La seconde méthode repose sur la séparation par CCM des lipides polaires (phospholipides) et apolaires, puis la minéralisation du phosphore présent dans les phospholipides, avant un dosage par spectrophotométrie. Ce protocole comporte deux points délicats :

- la récupération de l'ensemble de la silice correspondant au spot des phospholipides ;
- l'étape de minéralisation pour éviter une sous-estimation de la quantité de phospholipides.

Le tableau 3.12 présente la quantification des phospholipides dans les extraits lipidiques des tourteaux. Pour une matrice donnée, les résultats obtenus par RMN ^{31}P et dosage colorimétrique de Ames ne sont pas statistiquement différents. L'erreur sur la quantification par RMN ^{31}P est estimée entre 0,4 et 3%. Cette erreur est en accord avec d'autres études (Hatzakis et al., 2008; Kaffarnik et al., 2013). La méthode de Ames, par spectrophotométrie, est une méthode très sensible car elle permet de détecter quelques picomoles de phosphore dans l'échantillon. Cependant, parce qu'elle nécessite plusieurs étapes de préparation, l'erreur standard de déviation est rarement inférieure à 10%.

Tableau 3.12 : Quantification des phospholipides des lipides totaux des tourteaux végétaux.

| Teneur en PL (%mass de LT) | Cameline Bioplanète | Cameline Iterg | Lin | Chanvre | Sésame | Noix |
|----------------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------|-------------|--------------------------|-------------|
| Dosage Ames ¹ | 9,3 ± 2,4 ³ a | ND | 4,8 - 7,6bc | 4,4 - 5,5cd | 1,0 - 3,0 ² d | 8,1 - 8,8ab |
| RMN ^{31}P ¹ | 6,3 - 10,4a | 9,2 ± 1,8 ³ a | 5,4 - 7,8ab | 3,9 - 6,5ab | 0,7 - 2,0b | 9,7 - 10,8a |

¹ Les valeurs suivies d'une même lettre ne sont pas significativement différentes suivant le test HSD de Tukey au seuil de significativité de 95%.

² Mesures issues de 2 extractions de lipides totaux indépendantes

³ Moyenne de valeurs correspondant à 5 extractions de lipides totaux indépendantes

ND : non déterminé.

Quel que soit le tourteau considéré, les phospholipides représentent moins de 10% des lipides totaux. Le classement suivant peut-être établi pour les différents tourteaux étudiés :

Sésame < Chanvre < Lin < Cameline Iterg, Cameline Bioplanète et Noix.

Pour comparer les tourteaux entre eux vis-à-vis de leur teneur en PL, celle-ci est rapportée à 100 g de matière sèche (Tableau 3.13). Les tourteaux de cameline (Bioplanète et Iterg) apparaissent comme les tourteaux les plus riches en PL contenant environ 1 g pour 100 g de tourteau. A notre connaissance, aucune donnée n'existe sur les teneurs en phospholipides dans les tourteaux, mais

des valeurs sont reportées pour certaines graines (lin et sésame) et la noix. Ainsi, on relève de 0,1 à 2,3 g de PL pour 100 g de graines de lin (Daun et al., 2003), 1,4 g pour 100 g de graines de sésame (Kamal Eldin and Appelqvist, 1994) et 2,2 g pour 100 g de noix (Miraliakbari and Shahidi, 2008). Pour la noix et le sésame, nos valeurs significativement plus faibles (au moins 50%) que celles de la littérature suggèrent qu'il y a eu une perte de PL lors de la trituration. Pour le lin, il est difficile de dire, si il y a eu ou non extraction des PL au cours de l'étape de trituration, à cause de l'intervalle de valeurs de la littérature. Dans le cas de la cameline où les pourcentages de PL et de lipides dans la graine sont connus (0,3 % de PL et 40,9% de LT) (Mansour et al., 2014), il est possible de calculer la quantité de PL dans la graine, soit environ 0,7%. Cette valeur est très proche de celle déterminée dans les tourteaux de cameline (Iterg et Bioplanète).

Tableau 3.13 : Quantité de phospholipides présente dans les tourteaux oléagineux.

| Teneur en PL (%mass de mat. sèche) | Cameline Bioplanète | Cameline Iterg | Lin | Chanvre | Sésame | Noix |
|---------------------------------------|------------------------|-------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Dosage Ames | 1,2 | ND | 0,6 - 0,9 | 0,5 - 0,6 | 0,3 - 0,8 | 0,7 - 0,8 |
| RMN ³¹ P | 0,8 - 1,3 | 1,0 | 0,6 - 0,9 | 0,5 - 0,8 | 0,2 - 0,5 | 0,9 - 1,0 |

mat. : matière ; ND : non déterminé.

1.3.4.2 Identification et quantification des classes de phospholipides

La technique de la RMN ³¹P et les deux approches de LC-MS/MS permettent de quantifier les classes de phospholipides. Le tableau 3.14 présente la quantification des classes de PL obtenus par RMN ³¹P. Cependant, par cette technique, des indéterminations subsistent lors de l'attribution des signaux entre PI et LPC ou entre PE et SM, indéterminations levées par l'utilisation de la chromatographie liquide.

Tableau 3.14 : Classes de phospholipides des lipides totaux extraits des tourteaux végétaux déterminées par RMN ³¹P.

| PL (mol %) | Cameline Bioplanète | Cameline Iterg | Lin | Chanvre | Sésame | Noix |
|------------|------------------------|-------------------|-----|---------|--------|------|
| PC | 17 | 50 | 37 | 44 | 39 | 23 |
| PI | 24 | 23 | 24 | 25 | 13 | 24 |
| PE | 12 | 18 | 16 | 15 | 10 | 13 |
| PA | 42 | 6 | 21 | 14 | 35 | 38 |
| Autres | 5 | 3 | 2 | 2 | 3 | 2 |

PC : phosphatidylcholine ; PI : phosphatidylinositol ; PE : phosphatidyléthanolamine ; PA : acide phosphatidique ; PS : phosphatidylsérine.

Les principaux phospholipides identifiés dans les tourteaux végétaux sont : PC, PI, PE et PA. La phosphatidylcholine représente entre 17 et 50%mol des phospholipides. Elle est majoritaire dans les tourteaux de sésame, de chanvre, de cameline (Iterg) et de lin. L'acide phosphatidique est le

phospholipide majoritaire dans le tourteau de noix et de cameline (Bioplanète). Il est aussi en quantité non négligeable dans le tourteau de sésame et de lin (entre 21 et 35%mol). Les phospholipides, PI et PE, représentent respectivement 13 à 25%mol et 10 à 18%mol des phospholipides.

Les deux sources de tourteaux de cameline sont caractérisées par des profils en PL très différents : le faible pourcentage de PC dans le tourteau Bioplanète est associé à un pourcentage élevé d'acide phosphatidique. L'acide phosphatidique est généralement un phospholipide peu présent dans les cellules eucaryotes (environ 1%), car il est un intermédiaire dans le métabolisme cellulaire, en tant que précurseur de biosynthèse et messenger secondaire (Pasker et al., 2015). Il est produit, soit par hydrolyse de la tête polaire des phospholipides par la phospholipase D, soit par une cascade de réactions catalysées par la phospholipase C et la diacylglycérol kinase (Testerink and Munnik, 2011). Par ailleurs, il a été montré que l'augmentation de la quantité de PA (+19% mol) dans les cellules d'*Arabidopsis* est associée en réponse à un stress cellulaire, tel que le froid ou la sécheresse (Welti, 2002). Nos résultats suggèrent que le tourteau de cameline Bioplanète a subi des conditions de stockage (température et temps) ou de trituration des graines favorisant l'hydrolyse de la PC.

Pour comparer les résultats avec ceux de la littérature, l'hypothèse est faite qu'il n'y a pas d'extraction préférentielle de certains PL au cours du procédé de trituration. Les résultats de la cameline Iterg sont très proches de ceux donnés sur la graine (PC + PI = 79% des PL ; PE = 7% ; PA = 5% et PS = 1%) (Mansour et al., 2014). Cette similitude entre les résultats expérimentaux et la littérature est en faveur d'une dégradation potentielle de la PC en PA dans le tourteau de cameline Bioplanète. Dans le cas du lin, la phosphatidylcholine compose 37% des PL du tourteau, valeur qui se trouve dans l'intervalle de composition de PC dans la graine d'après Daun et collaborateurs (2003) (29,1 à 67,5% des PL). Par rapport à la graine de sésame (Tableau 3.4.A), le tourteau analysé dans notre étude contient 35% de PA, quantité deux fois supérieures à celle de la graine (13,7% des PL). Ce résultat est associé à une teneur faible en PC dans le tourteau (39%) tandis que dans la graine, il est de 55%. Enfin, pour le tourteau de noix, la principale différence vient de la teneur en acide phosphatidique, qui représente 38% des PL du tourteau et pas plus de 10% des PL du fruit (Angelova-Romova et al., 2013). Cette teneur en PA est accompagnée d'une teneur en PC de 23% valeur inférieure que celle trouvée dans la noix (39 à 43%).

1.3.4.3 Identification et composition en acides gras des phospholipides

La composition en acides gras des phospholipides des tourteaux est donnée dans le tableau 3.15. Les acides gras identifiés sont majoritairement des AGPI (40 à 53% des AG), représentés à plus de 60% par l'acide linoléique (18:2 n-6). Les acides gras saturés et les acides gras monoinsaturés composent respectivement 18 à 38% et 13 à 34% des AG totaux. Les AGS sont représentés principalement par l'acide palmitique (16:0) et l'acide stéarique (18:0), les AGMI par l'acide oléique. Le classement des tourteaux par leur teneur en AGPI n-3 dans les PL est le suivant :

Sésame < Noix < Chanvre < Lin < Cameline Iterg et Cameline Bioplanète.

Tableau 3.15 : Composition en acide gras (AG) des phospholipides extraits des lipides totaux des tourteaux.

| Acides gras (% mass) | Cameline ^a <i>Bioplanète</i> | Cameline <i>Iterg</i> | Lin | Chanvre | Sésame | Noix |
|--------------------------------|--|--------------------------|------|---------|--------|------|
| 16:0 | 18,4 | 14,7 | 17,7 | 22,2 | 14,9 | 25,0 |
| 18:0 | 6,1 - 6,5 | 2,8 | 7,2 | 8,1 | 8,1 | 10,8 |
| 18:1 (n-9) | 21,4 - 27,2 | 26,0 | 24,0 | 10,3 | 30,7 | 10,3 |
| 18:1 (n-7) | 0,7 - 1,4 | 1,4 | 1,3 | 1,5 | 0,7 | 1,2 |
| 18:2 (n-6) | 26,1 - 30,1 | 33,1 | 35,8 | 44,2 | 33,5 | 44,1 |
| 18:3 (n-3) | 14,6 - 17,9 | 18,4 | 11,4 | 7,9 | 5,4 | 4,8 |
| 20:0 | 0,1 - 0,3 | 0,1 | 0,1 | 0,7 | 1,0 | 0,4 |
| 20:1 (n-9) | 1,5 - 1,8 | 1,7 | 0,3 | 0,8 | 2,2 | 0,6 |
| 24:0 | 0,7 - 1,1 | 0 | 0,6 | 1,3 | 1,0 | 1,1 |
| Autres ^b | 2,4 - 3,4 | 1,7 | 1,5 | 2,9 | 2,5 | 1,7 |
| Σ AGS ^c | 27,8 - 28,6 | 18,3 | 26,6 | 33,6 | 25,7 | 38,0 |
| Σ AGMI ^c | 24,4 - 30,7 | 29,5 | 25,9 | 13,4 | 34,3 | 12,8 |
| Σ AGPI ^c | 41,8 - 49,0 | 52,2 | 47,5 | 53,0 | 39,9 | 49,3 |
| Σ AGPI n-6 ^c | 27,1 - 31,1 | 33,8 | 36,1 | 45,1 | 34,4 | 44,4 |
| Σ AGPI n-3 ^c | 14,6 - 17,9 | 18,4 | 11,4 | 7,9 | 5,5 | 4,9 |
| Ratio n-6:n-3 | 1,5 - 2,1 | 1,8 | 3,2 | 5,7 | 6,2 | 9,1 |

^a Résultats de deux extractions de PL et de préparations d'esters méthyliques indépendantes.

AGS : acides gras saturés ; AGMI : acides gras monoinsaturés ; AGPI : acides gras polyinsaturés.

La comparaison de la composition en AG des lipides totaux (qui peut être assimilée en première approximation à celle des TAG et AG libres, qui représentent plus de 72% des LT (Tableau 3.11)) et celle des PL, montre les différences suivantes :

- la teneur en AGPI des PL est systématiquement inférieure à celle des LT (de 10 à 20% en fonction des tourteaux) ;
- excepté pour le tourteau de sésame, la teneur en APGI n-3 des PL est toujours inférieure à celle des LT correspondant. Il en résulte que le rapport AGPI n-6/n-3 qui était inférieur à 1 pour les LT de la cameline et du lin, est supérieur à 1 dans les PL ;
- la diminution des AGPI dans les PL des tourteaux est contrebalancée par une augmentation des taux d'AGS d'un facteur compris entre 1,3 et 3,3.

En revanche, la quantité d'AGMI est du même ordre de grandeur dans les LT et les PL. Ces résultats sont cohérents avec l'analyse des TAG et PL de la graine de sésame (Kamal-Eldin and Appelqvist, 1994) et de lin (Cunnane et al., 1993) qui ont aussi mis en évidence une augmentation des AGS des PL au détriment des AGPI par rapport aux valeurs reportées dans les TAG.

1.3.4.4 Espèces de phospholipides

La figure 3.7 représente les principales espèces de phospholipides identifiées dans les tourteaux végétaux. Les acides gras présents dans les classes de phospholipides et identifiés par LC-MS sont en accord avec ceux déterminés en CPG dans les PL. Chaque classe de PL est caractérisée par deux à quatre espèces de PL prépondérantes qui sont trouvées dans tous les tourteaux. De manière générale, pour toutes les espèces de PL composées d'un acide gras saturé et d'un acide gras insaturé, ce dernier est estérifié en position interne (sn-2). Cette position pourrait lui conférer une stabilité oxydative accrue par rapport à la position externe (Henna Lu et al., 2011). Pour PA, on détecte majoritairement, PA 16:0/18:2, PA 18:2/18:2 et PA 18:1/18:2 en proportion variant entre 10 et 35%. Pour une classe de PA donnée, des variations significatives entre les sources végétales sont observées. Par exemple, PA 16:0/18:2 est deux fois plus abondant dans la noix que dans les autres tourteaux. En revanche, PA 18:2/18:2 est beaucoup plus ubiquitaire. Ces observations sont aussi valables pour PE. Pour PI, quelle que soit la source végétale, PI 16:0/18:2 est largement représenté (30%mol et plus). Cette espèce représente près de la moitié des PI pour la noix et le sésame. La PC est représentée par davantage d'espèces moléculaires : PC 16:0/18:2, PC 18:2/18:2 et PC 18:1/18:2, mais aussi PC 18:1/18:1 et PC 18:0/18:2 (Buré et al., 2016). Pour chaque classe de phospholipides, la présence d'espèces moléculaires à double AGPI est à noter. Ces espèces moléculaires sont aussi identifiées dans la fraction phospholipidiques d'huile de lin (Herchi et al., 2011).

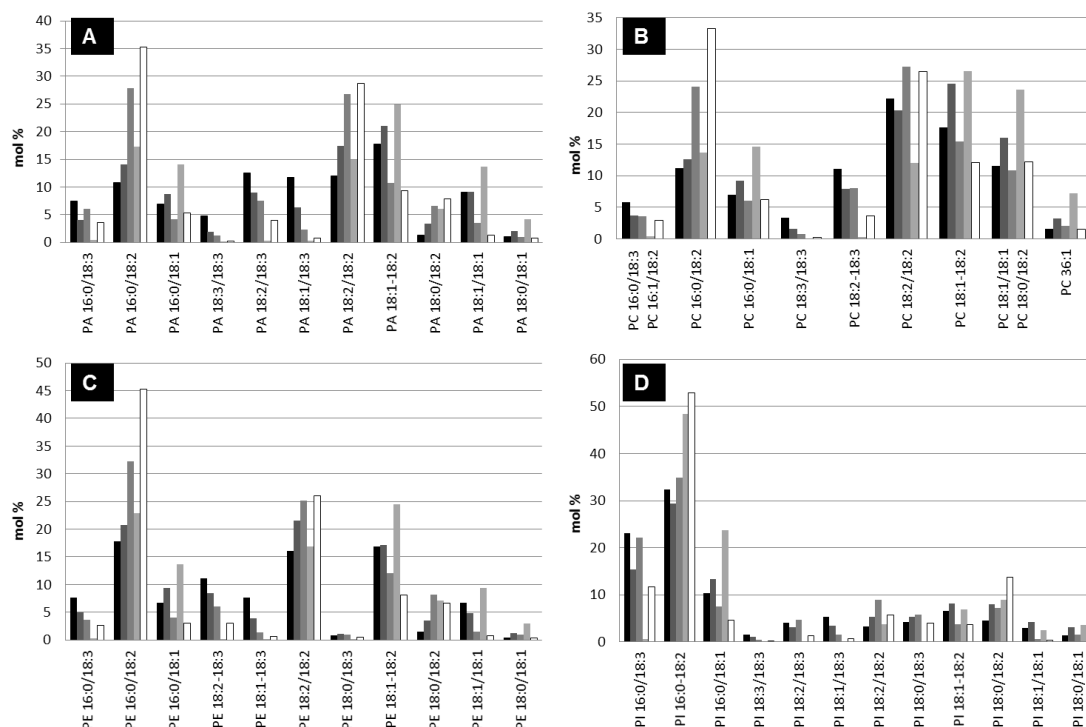


Figure 3.7 : Composition moléculaire des principaux phospholipides présents dans les tourteaux de cameline (■), lin (■), chanvre (■), sésame (■) et noix (□), obtenu par LC-MS en phase normale. Espèces moléculaires de A : acide phosphatidique (PA) ; B : phosphatidylcholine (PC) ; C : phosphatidyléthanolamine (PE) ; D : phosphatidylinositol (PI).

Nomenclature : PE 16:0/18:3 signifie que l'acide gras 16:0 et l'acide gras 18:3 sont respectivement estérifiés en position sn-1 et sn-2. PA 18:1-18:2 signifie qu'on arrive pas à identifier la position respective des acides gras sur le squelette glycérol du phospholipide.

I.4 COMPOSITION EN LIPIDES DES SOUS-PRODUITS DE LA COQUILLE SAINT JACQUES

La coquille Saint Jacques (*ou Pecten maximus*), mollusque bivalve de la famille des Pectinidés, vit dans les eaux tempérées jusqu'à une profondeur d'une centaine de mètres (Andersen et al., 2011). Elle se développe le long de la côte ouest de l'Europe, du nord de la Norvège au sud de la péninsule ibérique et sa pêche est autorisée du 1^{er} octobre au 15 mai en France avec des quotas et des horaires à respecter pour préserver les ressources naturelles.

Des travaux sur les sous-produits de la coquille Saint Jacques ont déjà été réalisés dans l'équipe Clip'In (Thong Deng, 2011). Une teneur en LT de 9%mass de matière sèche a été trouvée, dont 21 ± 6% étaient attribués à des phospholipides et des phosphonolipides. La teneur en AGPI n-3 estérifiés sur les lipides phosphorés était de 9%mass des AG, avec la présence de 3% d'EPA et 4% de DHA. Notre étude porte sur un nouveau lot de coquille Saint Jacques. Sachant que d'après la littérature, la composition en lipides des produits marins peut varier en fonction des conditions climatiques et de la période de pêche, nous avons caractérisé la matière première pour sa teneur en LT, lipides phosphorés et composition en acides gras. Par ailleurs, nous avons quantifié les classes de LT grâce aux nouvelles méthodes mises en place au cours de ce travail de thèse.

I.4.1 Quantification et identification des lipides totaux

Les sous-produits de la coquille Saint Jacques, collectés entre novembre 2012 et janvier 2013, sont composés de la glande digestive, du manteau, des branchies et du pied. Dans cette matrice, la fraction lipidique représente $12,8 \pm 0,7\%$ mass de matière zéodratée, soit $14,3 \pm 0,8\%$ mass de matière sèche. Ces résultats sont légèrement supérieurs à ceux précédemment obtenus pour le même type de matrice (9% mass de matière sèche (Thong Deng, 2011)). Le tableau 3.16 présente les classes de lipides identifiées par LC-DEDL (pour les lipides neutres et les acides gras libres), par dosage colorimétrique et RMN ^{31}P (pour les lipides phosphorés).

Tableau 3.16 : Classes de lipides des sous-produits de la coquille Saint Jacques.

| Classes de lipides | Quantité (g. 100 g ⁻¹ de LT) |
|----------------------------------|--|
| Triglycérides ^a | 21,3 - 21,6 |
| Diglycérides ^a | 6,1 - 6,2 |
| Monoglycérides ^a | 12,5 - 16,4 |
| Acides gras libres ^a | 33,7 - 34,2 |
| Esters de stérols ^a | 1,8 - 2,2 |
| Lipides phosphorés | |
| Dosage de Ames ^b | $12,2 \pm 2,5$ |
| RMN ^{31}P ^c | $11,8 \pm 4,8$ |

^a Résultats obtenus après deux mesures d'un même échantillon par chromatographie liquide couplée à la DEDL

^b Résultats obtenus par le dosage Ames à partir de 4 extractions de Folch indépendantes

^c Résultats obtenus par RMN ^{31}P à partir de 5 extractions de Folch indépendantes

Les lipides majoritaires identifiés dans les sous-produits de la coquille Saint Jacques sont les acides gras libres qui représentent environ $34 \text{ g.}100 \text{ g}^{-1}$ de lipides totaux, tandis que les acylglycérols (mono, di et triglycérides) représentent environ $45 \text{ g.}100 \text{ g}^{-1}$ de LT. Les lipides phosphorés sont des phospholipides et des phosphonolipides ($12 \text{ g.}100 \text{ g}^{-1}$ de LT). Leur teneur est cohérente avec celle précédemment obtenue pour le même type de matrice ($21 \pm 6\%$ (Thong Deng, 2011)). Les esters de stérols ($2 \text{ g.}100 \text{ g}^{-1}$ de LT) sont des espèces minoritaires.

La littérature sur la coquille Saint Jacques concerne des organes analysés séparément (glande digestive, manteau et branchies) et non un mélange comme étudié dans ce projet. Néanmoins, les acylglycérols, les phospholipides et les stérols totaux sont des lipides identifiés dans la glande digestive (Pazos et al., 2003). Ces lipides sont également présents dans le mélange de sous-produits utilisé. La discussion autour des valeurs des teneurs en lipides est plus délicate. En effet, la glande digestive ne représente que 25 à 33% des sous-produits de la coquille Saint Jacques et la quantité des différents lipides est variable au cours d'une même année (Pazos et al., 2003 ; Pazos et al., 1997). En effet, la glande digestive est un organe de stockage d'énergie pour la coquille Saint Jacques (Le Pennec et al., 2001 ; Pazos et al., 2003). Par exemple, la teneur en acylglycérols peut varier entre 19% (en mai) et 77% (en août). Lorsque la teneur en acylglycérols est faible, il reste

environ 55% de lipides non identifiés. Les résultats obtenus entre les mois de novembre et de février montrent que les lipides non attribués de la glande digestive représentent entre 20 et 53 g. 100 g⁻¹ des lipides. Si on se reporte à nos résultats, une partie de ces lipides pourrait correspondre à des AGL puisqu'ils sont dosés en quantité importante dans les sous-produits de la coquille Saint Jacques.

I.4.2 Classes de lipides phosphorés

Des lipides phosphorés variés sont identifiés dans les sous-produits de la coquille Saint Jacques, principalement représentés par les phospholipides PC, PS, PE et leurs dérivés (plasmalogènes et lysophospholipides) (Tableau 3.17). D'autres classes de phospholipides sont aussi quantifiées mais présentes à des taux inférieurs à 5% : PI, PA, PG et CL. Les plasmalogènes sont des éther-phospholipides, constitués d'une base sur laquelle un acide gras se lie par liaison vinyl-éther et un second acide gras par une liaison ester. Ces plasmalogènes avec une tête polaire choline ou éthanolamine représentent 25 à 27% des lipides phosphorés. Un autre type de lipides phosphorés, trouvé principalement chez les espèces invertébrées marines, est repéré dans les sous-produits de la coquille Saint Jacques : les phosphonolipides. Ils se différencient des phospholipides par la présence d'un groupement phosphonate à la place d'un groupement phosphate. Cette liaison phosphonate est aussi trouvée dans les sphingolipides et dans les plasmalogènes (Joseph, 1982). Ces lipides sont des éléments structuraux de la membrane cellulaire (Ternes and Jaekel, 2010). Ils ont principalement trouvés dans les espèces marines (anémones, mollusques, éponges et huîtres), certains mammifères, diverses bactéries et dans des végétaux (noyau d'abricot) (Mukhamedova and Glushenkova, 2000). Chez *Crassostrea virginica* (huître trouvée en Amérique du Nord), les phosphonolipides sont conservés au contraire des phospholipides qui sont hydrolysés en situation de stress physiologique (reproduction ou jeûne) (Moschidis, 1985).

Tableau 3.17 : Classes des phospholipides des sous-produits de la coquille Saint Jacques déterminées par RMN ³¹P (Résultat obtenu à partir de deux extractions de LT indépendantes).

| Classes de PL | % mol |
|------------------|-------------|
| PC | 14,8 – 14,9 |
| PCp | 12,3 – 13,4 |
| PI | 1,4 – 2,2 |
| LPC | 8,0 – 10,6 |
| LPCp | 1,5 – 2,4 |
| PS | 7,1 – 8,3 |
| PE | 6,8 – 8,7 |
| PEp | 9,8 – 12,5 |
| CL | 2,3 – 2,5 |
| PA | 3,2 – 3,8 |
| PG | 3,9 – 4,1 |
| LPE / LPEp | 4,3 – 4,4 |
| Phosphonolipides | 18,2 – 18,4 |

PC : phosphatidylcholine ; PI : phosphatidylinositol ; LPC lysophosphatidylcholine ; PS : phosphatidylsérine ; PE : phosphatidyléthanolamine ; CL : cardiolipine ; PA : acide phosphatidique ; PG : phosphatidylglycérol ; LPE : lysophosphatidyléthanolamine ; p = plasmalogènes.

Trois familles de lipides phosphorés sont aussi identifiées dans le manteau et les branchies de la coquille Saint Jacques *Pectens maximus* (Kraffe et al., 2006) : à base d'éthanolamine (79 à 87%mol), de sérine (14 à 32 %mol) et de choline (environ 5%mol). Dans les sous produits de la coquille Saint Jacques, ce sont les espèces à base de choline qui sont majoritaires. De plus, si la PS est bien détectée dans nos échantillons, nous n'avons pas relevé de plasmalogènes dans la famille de la sérine alors qu'ils sont quantifiés dans les branchies (4,5 %mol) et le manteau (1,9 mol%). Les plasmalogènes représentent une quantité importante de phospholipides dans ces organes (entre 35 et 40% des phospholipides) (Kraffe et al., 2006), tout comme dans notre cas, où ils représentent entre 28 et 32% des lipides phosphorés quantifiés. La cardiolipine trouvée dans les branchies et le manteau de la coquille Saint Jacques en faible proportion (<1%) (Kraffe et al., 2006) est détectée dans nos échantillons. Enfin, des phosphonolipides sont aussi trouvés dans les organes des mollusques bivalves. Chez *Crassostrea virginica*, les phosphonolipides représentent 24% des lipides phosphorés de l'ensemble manteau/branchies et 12,8% dans les viscères (Joseph, 1982).

I.4.3 Composition en acides gras des lipides totaux et des lipides phosphorés

La composition en acides gras des lipides totaux déterminée par CPG est présentée dans le tableau 3.18. La particularité des produits marins tels que la coquille Saint Jacques vient de la variété des longueurs des chaînes des AG (14 à 22 atomes de carbone). Les acides gras majoritaires sont les acides gras polyinsaturés (47% des AG totaux), dont 92% sont des AGPI n-3, représentés par l'EPA (20:5 n-3) et le DHA (22:6 n-3), acides gras caractéristiques des produits d'origine marine. Les sous-produits de la coquille Saint Jacques sont aussi riches en acides gras saturés (35%). Dans une étude sur les sous-produits de la coquille Saint Jacques, (Thong Deng, 2011), les AGS représentaient plus de 70% des AG, tandis que les AGPI n-3 ne représentaient pas plus de 8% des AG avec 3,5% de DHA et 2,1% d'EPA. Cette différence importante dans la composition en AG avec nos résultats pourrait provenir du moment et du lieu de la récolte des coquilles et d'une différence dans le protocole d'échantillonnage (pas de constitution d'un lot unique de sous produits).

Tableau 3.18 : Composition en acides gras des lipides totaux et des lipides phosphorés des sous-produits de la coquille Saint Jacques, déterminée par CPG.

| Composition en AG (%mass) | Lipides totaux | Lipides phosphorés |
|------------------------------|----------------|--------------------|
| 14:0 | 7,5 ± 0,2 | 4,0 ± 0,6 |
| 16:0 | 19,0 ± 0,6 | 21,4 ± 2,0 |
| 16:1 (n-7) | 6,9 ± 0,1 | 1,7 ± 0,3 |
| 17:0 | 1,2 ± 0,1 | 1,8 ± 0,1 |
| 18:0 | 5,8 ± 0,2 | 12,7 ± 2,2 |
| 18:1 (n-9) | 3,4 ± 0,1 | 2,3 ± 0,1 |
| 18:1 (n-7) | 3,9 ± 0,1 | 2,2 ± 0,2 |
| 18:2 (n-6) | 1,4 ± 0,0 | 1,0 ± 0,2 |
| 18:3 (n-3) | 1,3 ± 0,9 | 0,8 ± 0,3 |
| 18:4 (n-3) | 5,8 ± 0,0 | 1,9 ± 0,2 |
| 20:1 (n-9) | 1,0 ± 0,1 | 4,2 ± 0,3 |
| 20:1 (n-7) | 1,0 ± 0,0 | 0,7 ± 0,1 |
| 20:3 (n-3) | 1,3 ± 1,1 | 4,2 ± 0,2 |
| 20:4 (n-6) | 0,8 ± 1,0 | 0,3 ± 0,3 |
| 22:1 (n-11) | 0,8 ± 0,0 | 0,2 ± 0,0 |
| 20:5 (n-3) | 20,0 ± 0,0 | 10,0 ± 0,6 |
| 22:3 (n-3) | 1,2 ± 0,0 | 4,1 ± 1,6 |
| 22:4 (n-3) | 1,1 ± 0,0 | 0,5 ± 0,0 |
| 22:6 (n-3) | 12,3 ± 0,1 | 22,1 ± 0,7 |
| Autres | 4,2 | 3,9 |
| Σ AGS | 34,6 ± 0,8 | 41,0 ± 4,3 |
| Σ AGMI | 17,7 ± 0,3 | 11,5 ± 0,8 |
| Σ AGPI | 47,5 ± 1,1 | 47,5 ± 3,6 |
| Σ AGPI (n-6) | 3,2 ± 0,9 | 2,6 ± 0,5 |
| Σ AGPI (n-3) | 43,7 ± 1,0 | 44,5 ± 2,9 |

AGS : acide gras saturé ; AGMI : acide monoinsaturé ; AGPI : acide gras polyinsaturé.

La composition en acides gras des lipides phosphorés (Tableau 3.18), indique que les principaux acides gras estérifiés sont les acides gras polyinsaturés (avec une majorité d'AGPI n-3) et les acides gras saturés (16:0 et 18:0). On remarque qu'il y a deux fois plus d'EPA dans les lipides totaux que dans les lipides phosphorés, cette proportion étant inversée pour le DHA. Dans le cas de la thèse de Thong Deng (2011), les AGS représentaient plus de 62% des AG estérifiés sur les PL, tandis que les AGPI n-3 ne représentaient pas plus de 10% des AG (4% de DHA et 3% d'EPA).

La comparaison avec les données de la littérature est difficile, d'une part, à cause de la saisonnalité (Pazos et al., 2003), d'autre part, à cause de la nature des organes étudiés : glande digestive (Pazos et al., 2003), le manteau et les branchies (Kraffe et al., 2006) ou des classes de lipides analysées : acylglycérols et PL (Pazos et al., 2003), PL totaux et plasmalogènes (Kraffe et al.,

2006). Néanmoins, dans tous les cas, les AGS et les AGPI n-3 (EPA et DHA) sont les acides gras majoritaires (sur la période étudiée).

1.5 CONCLUSION

Cette partie vise à identifier et quantifier les lipides totaux de différentes matrices d'origine végétale et animale, de manière à choisir les sources riches en PL et en AGPI n-3, qui vont être utilisées dans les expériences d'extraction supercritique.

Parmi les tourteaux d'oléagineux étudiés, les plus riches en phospholipides sont la cameline et la noix. En termes de classes de phospholipides, les tourteaux d'oléagineux ont des compositions spécifiques même si on fait abstraction du taux de PA. Ce phospholipide présente des taux variables d'un tourteau à l'autre, ce qui pourrait être dû aux conditions de stockage des graines. Si on se place du point de vue du formulateur de liposomes, un taux élevé de PC est une garantie de formation de vésicules. A ce titre, le tourteau de sésame serait le plus intéressant. Néanmoins, si le critère de choix est la forte proportion d'acides gras polyinsaturés n-3, alors la cameline est la mieux placée, notamment vis-à-vis de la noix. Par ailleurs, le tourteau de noix présente un inconvénient nutritionnel à cause des allergies potentielles vis-à-vis des fruits à coques. Ainsi, nous avons choisi la cameline comme matrice végétale pour les extractions supercritiques.

Les sous-produits de la coquille Saint Jacques ont déjà été étudiés (Thong Deng, 2011). Nous avons confirmé la présence de PL dans le nouveau lot utilisé pour ce projet. Nous avons aussi affiné l'identification des différents lipides totaux et notamment des PL. Ainsi, les sous-produits de la coquille Saint Jacques présentent une variété importante de lipides phosphorés avec la présence de plasmalogènes et de phosphonolipides. De plus, la présence d'AGPI n-3 à très longue chaîne est confirmée à la fois dans les lipides totaux mais aussi dans la fraction des phospholipides.

Ainsi, dans le but de formuler des vésicules phospholipidiques riches en acides gras polyinsaturés n-3, les deux tourteaux de cameline et les sous-produits de la coquille Saint Jacques sont retenus. Néanmoins, pour l'étude de certains paramètres de l'extraction des phospholipides par fluide supercritique, les tourteaux de lin et de sésame sont aussi utilisés.

II. Extraction des phospholipides par voie supercritique

Ce chapitre porte sur l'application du CO₂ supercritique pour l'extraction des phospholipides, de façon sélective vis-à-vis des autres lipides. Dans un premier temps, les essais réalisés et les paramètres étudiés sont présentés. Dans un second temps, la méthodologie expérimentale est vérifiée par l'étude de la reproductibilité des extractions à partir de deux matrices (tourteau de cameline, sous-produits de la coquille Saint Jacques) et pour divers pourcentage d'éthanol. Suite à cela, un protocole d'extraction de phospholipides dans le réacteur de 100 mL ($\varnothing = 3$ cm et $h = 14$ cm) est présenté. Comme indiqué dans le § II.2.2 (Chapitre 1), l'extraction des phospholipides nécessite la présence d'un co-solvant : l'éthanol. Le pourcentage optimal d'éthanol dans le CO₂ est déterminé par l'analyse des résultats d'extractions conduites avec différents pourcentages d'éthanol. Par la suite, le protocole mis en place pour le réacteur de 100 mL est testé dans un réacteur de 500 mL ($\varnothing = 5$ cm et $h = 25$ cm), afin d'évaluer la transposition potentielle du procédé. Il est aussi testé sur deux autres matrices : tourteaux de lin et de sésame.

L'analyse bibliographique a permis de cerner les conditions opératoires les plus utilisées dans le cas de l'extraction des lipides neutres et des phospholipides (Tableau 3.19). Généralement, dans le cas de l'extraction des phospholipides, les pressions appliquées au système sont supérieures à 40 MPa. Les limitations techniques du matériel mis à disposition empêchent de monter à des pressions supérieures à 32 MPa. Ainsi, la pression et la température retenues pour cette étude sont 25 MPa et 45°C.

Tableau 3.19 : Pression/température appliquées pour l'extraction des lipides neutres et des phospholipides.

| Paramètres opératoires | Lipides neutres | Phospholipides |
|------------------------|-----------------|----------------|
| Pression (MPa) | 20,0 – 38,0 | 15,0 – 68,9 |
| Température (°C) | 45 – 60 | 27 – 80 |

II.1 PLANS DES ESSAIS ET PARAMETRES ETUDIES

Plus d'une trentaine d'essais sont réalisés, afin d'étudier l'impact de différents paramètres sur l'extraction des phospholipides. Le tableau 3.20 résume l'ensemble des paramètres testés : matrice, masse chargée, volume de réacteur employé, protocole appliqué et analyses réalisées sur les fractions collectées. En effet, un fractionnement est opéré au cours des extractions afin de déterminer de façon plus précise le temps d'extraction des phospholipides et ainsi obtenir des fractions riches en PL.

Dans le cas d'extractions à partir de matrices oléagineuses, des fractions biphasiques sont obtenues en début d'extraction (F0, parfois F1 et F2) (Figure 3.8.B). La phase huileuse est assimilée à

la masse totale en lipides dans la fraction. Dans le cas des essais réalisés sur les sous-produits de la coquille Saint Jacques, une fraction homogène est obtenue (Figure 3.8.A). Il est donc nécessaire de réaliser un dosage des LT par la méthode de Folch pour ces fractions issues de la coquille Saint Jacques.

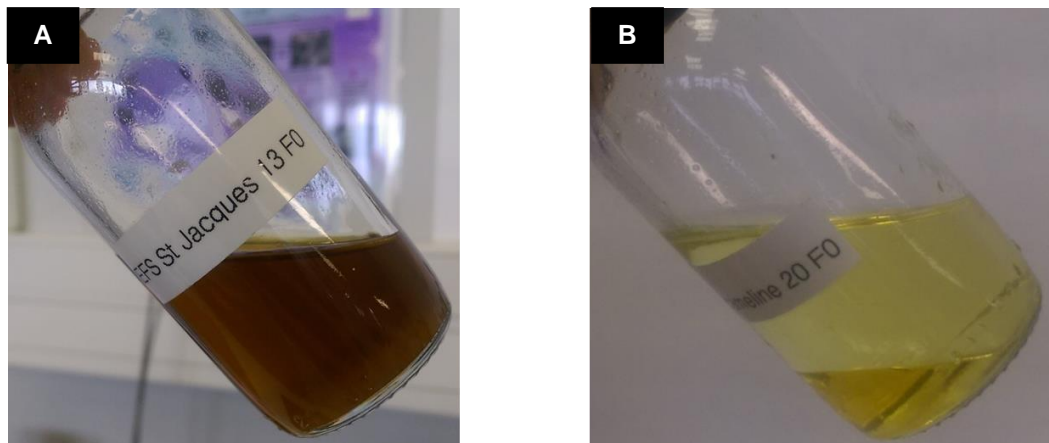


Figure 3.8 : Fractions F0 obtenues lors d'une extraction avec gradient d'éthanol dans le réacteur de 100 mL à partir de la coquille Saint Jacques (EFS St Jacques 13, débit $CO_2 = 7,9 \text{ g.min}^{-1}$) (A) et à partir de la cameline Iterg (EFS Cameline 20 F0, débit $CO_2 = 6,7 \text{ g.min}^{-1}$) (B).

Enfin, bien que l'extraction des phospholipides soit l'objectif premier, leur analyse dans toutes les fractions n'a pas été réalisée à cause de la disponibilité du spectromètre RMN. Pour ces raisons, la majorité des courbes de cinétique présentées concerne la masse totale extraite. Cependant, tous les résidus sont analysés en termes de LT et de PL afin de calculer les différents rendements (§ II.3- Chapitre 2). Enfin, deux tourteaux de cameline provenant de deux fournisseurs différents sont utilisés car la quantité de tourteau de cameline Bioplanète n'était pas suffisante pour réaliser la totalité des essais.

Tableau 3.20 : Extractions par fluide supercritique : conditions opératoires et analyses des fractions ($T = 45^{\circ}\text{C}$, $P = 25 \text{ MPa}$, débit moyen de $\text{CO}_2 = 6,5 \pm 0,5 \text{ g.min}^{-1}$ pour le réacteur de 100 mL, débit moyen de $\text{CO}_2 = 14,0 \pm 1,1 \text{ g.min}^{-1}$ pour le réacteur de 490 mL, débit d'éthanol variable selon la composition du mélange souhaitée).

| | | | | Analyse des fractions | | | Analyse du résidu | | |
|---------------------|-----------------|-------------------|-----------|----------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|--------------------|---------------------------------|---|
| Nom de l'extraction | Réacteur | Masse chargée (g) | Protocole | Masse phase lourde ou LT | Composition en AG (phase lourde) | Dosage des PL (RMN ³¹ P) | Dosage LT (Folch) | Dosage PL (RMN ³¹ P) | |
| Cameline Bioplanète | EFS Cameline 4 | 100 mL | 60,0 | 0% EtOH | F0, F1, F2, F3, F4 | - | - | O | O |
| | EFS Cameline 5 | 100 mL | 54,0 | 2% EtOH | F0, F1, F2 | - | - | O | O |
| | EFS Cameline 12 | 100 mL | 53,7 | 2% EtOH | F0, F1, F2, F3 | - | - | O | O |
| | EFS Cameline 3 | 100 mL | 60,0 | 7% EtOH | F0, F1 | - | - | O | O |
| | EFS Cameline 7 | 100 mL | 56,4 | 7% EtOH | F0, F1 | - | - | O | O |
| | EFS Cameline 9 | 100 mL | 52,5 | 7% EtOH | F0, F1 | - | - | O | O |
| | EFS Cameline 2 | 100 mL | 60,0 | 15% EtOH | F0 | F0 | F0, F1 | O | O |
| | EFS Cameline 8 | 100 mL | 57,5 | 15% EtOH | F0 | - | F1 | O | O |
| | EFS Cameline 1 | 100 mL | 57,8 | 30% EtOH | - | F0 | F0, F1, F2 | O | O |
| | EFS Cameline 6 | 100 mL | 55,9 | 30% EtOH | F0 | - | F0, F1 | O | O |
| | EFS Cameline 10 | 100 mL | 55,0 | Gradient EtOH ^b | F0, F1 | - | F0, F1, F2, F3, F4 | O | O |
| | EFS Cameline 11 | 490 mL | 60,0 | Gradient EtOH | F0, F1 | - | F2, F3, F4, F5 | O | O |
| | EFS Cameline 13 | 490 mL | 119,9 | Gradient EtOH | F0, F1, F2 | - | F3, F4, F5, F6 | O | O |
| Cameline Iterg | EFS Cameline 14 | 490 mL | 120,1 | Gradient EtOH | F0, F1, F2 | - | F3, F4, F5, F6 | O | O |
| | EFS Cameline 17 | 100 mL | 53,9 | Gradient EtOH | F0, F1 | - | F2, F3 | O | O |
| | EFS Cameline 18 | 100 mL | 50,7 | Gradient EtOH | F0, F1 | - | F2, F3 | O | O |
| | EFS Cameline 19 | 100 mL | 46,4 | Gradient EtOH | F0, F1 | - | F2, F3, F4 | O | O |
| | EFS Cameline 20 | 100 mL | 49,1 | Gradient EtOH | F0, F1 | - | F2, F3 | O | O |

CHAPITRE 3 – RÉSULTATS ET DISCUSSION

| | | | | | | | | | |
|------------------------|-------------------|--------|------|---------------|--------------------|----|------------------------------------|----------------|----------------|
| | EFS Cameline 21 | 100 mL | 15,6 | Gradient EtOH | F0, F1 | - | F2, F3 | O | O |
| | EFS Cameline 22 | 100 mL | 50,0 | Gradient EtOH | F0, F1 | - | F2, F3 | O | O |
| | EFS Cameline 23 | 100 mL | 43,2 | Gradient EtOH | F0, F1 | - | F2, F3 | O | O |
| Coquille Saint Jacques | EFS St Jacques 12 | 100 mL | 35,0 | 7% EtOH | - | - | - | O | O |
| | EFS St Jacques 8 | 100 mL | 37,0 | 15% EtOH | F0, F1, F2, F3 | - | F0, F1, F2, F3, F4 | O | O |
| | EFS St Jacques 9 | 100 mL | 35,8 | 15% EtOH | - | - | - | O | N |
| | EFS St Jacques 10 | 100 mL | 35,0 | 15% EtOH | - | - | - | O | N |
| | EFS St Jacques 11 | 100 mL | 33,0 | 30% EtOH | F0, F1, F2, F3, F4 | - | F0, F1, F2, F3, F4 | O | O |
| | EFS St Jacques 13 | 100 mL | 32,8 | Gradient EtOH | - | - | F2, F3 | O | O |
| | EFS St Jacques 3 | 490 mL | 30,0 | Gradient EtOH | F0, F1, F2, F3, F4 | - | F0, F1, F2, F3, F4 | O | O |
| | EFS St Jacques 7 | 490 mL | 30,0 | Gradient EtOH | F0, F1, F2, F3, F4 | - | F0, F1, F2, F3, F4 | O | O |
| | EFS St Jacques 5 | 490 mL | 60,0 | Gradient EtOH | F0, F1, F4, F5, F6 | - | F0, F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8 | O | O |
| | EFS St Jacques 6 | 490 mL | 30,0 | 30% EtOH | - | - | F0, F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8 | O | O |
| Lin Bioplanète | EFS Lin 1 | 490 mL | 35,0 | Gradient EtOH | - | F0 | F2, F3 | O | O |
| | EFS Lin 2 | 490 mL | 35,0 | Gradient EtOH | F0 | F0 | F2, F3 | O | O |
| | EFS Lin 3 | 490 mL | 35,2 | 27% EtOH | F0 | - | F0, F1 | O | O |
| | EFS Lin 4 | 490 mL | 35,0 | Gradient EtOH | F0 | - | F2, F3 | O | O |
| Sésame Bioplanète | EFS Sésame T1 | 490 mL | 35 | Gradient EtOH | - | F0 | F2, F3 | O | O |
| | EFS Sésame T2 | 490 mL | 35 | 27% EtOH | - | F0 | F0, F1 | O ^a | O ^a |
| | EFS Sésame T3 | 490 mL | 35 | 27% EtOH | F0 | - | F0 | O | O |

^a Le dosage des lipides totaux et des phospholipides ont été réalisés. Cependant la masse du résidu est incertaine à cause d'un souci lors de la récupération du résidu.

^b Gradient d'éthanol avec 7% EtOH, puis 27% EtOH.

AG = acide gras ; LT = lipides totaux ; PL : phospholipides ; RMN ³¹P : résonance magnétique nucléaire à partir du phosphore ; EFS : extraction par fluide supercritique ; EtOH : éthanol ; O = oui ; N = non.

II.2 INFLUENCE DU POURCENTAGE D'ETHANOL POUR L'EXTRACTION DES PHOSPHOLIPIDES

II.2.1 Validation du protocole d'extraction

La reproductibilité de l'extraction est étudiée sur le tourteau de cameline et les sous-produits de la coquille Saint Jacques à taux fixe d'éthanol dans le CO₂.

Pour les sous-produits de la coquille Saint Jacques, la figure 3.9 présente l'évolution des masses totales extraites rapportées à la masse chargée en fonction du temps. La courbe de cinétique d'extraction suit une allure classique. La première partie de la courbe représente l'extraction des espèces les plus disponibles, par exemple celles situées à la surface des particules de la charge. La limite de ce transfert dépend de la solubilité de l'espèce dans le solvant, qui peut être estimée par la pente de la droite à partir de la représentation graphique $m_{\text{ext}} \text{ cumulée} = f(m_{\text{fluide}})$. La seconde partie se caractérise par une pente plus faible, voire par un plateau, due à l'épuisement progressif de la matrice en solutés extractibles et/ou à un transfert plus lent des espèces, par exemple depuis l'intérieur des particules vers le fluide.

Cette évolution au cours de l'extraction s'observe aussi au niveau macroscopique, par un éclaircissement des fractions. Par exemple, dans le cas de l'extraction des sous-produits de la coquille Saint Jacques, les fractions évoluent d'un vert très opaque tirant vers le noir pour la première fraction vers un vert très clair pour la dernière (Figure 3.9). Cet éclaircissement progressif de la couleur des fractions est observé dans toutes les extractions à teneur fixe en éthanol, que ce soit à partir de la coquille Saint Jacques ou du tourteau de cameline.

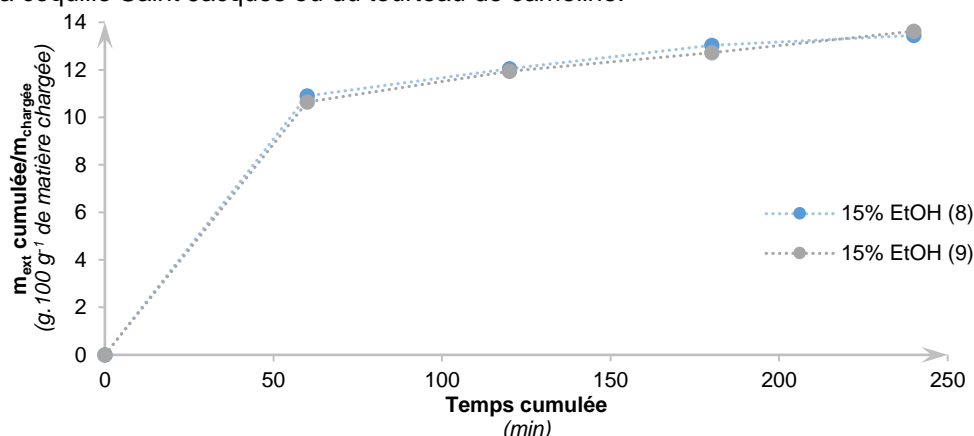


Figure 3.9 : Reproductibilité de l'extraction à taux fixe d'éthanol (15%mass EtOH) dans le réacteur de 100 mL à partir de la coquille Saint Jacques $P = 25 \text{ MPa}$, $T = 45^\circ\text{C}$, (EFS St Jacques 8 : débit CO₂ = 6,7 g.min⁻¹, débit d'éthanol = 1,1 g.min⁻¹ ; EFS St Jacques 9 : débit CO₂ = 6,5 g.min⁻¹, débit d'éthanol = 1,1 g.min⁻¹).

Le tableau 3.21 présente les principales caractéristiques obtenues lors d'une extraction pour deux essais réalisés dans des conditions expérimentales similaires. Le bilan matière n'est pas toujours cohérent. En effet, la différence entre la masse de la charge et la masse du résidu (Δm) diffère de la masse totale extraite, quantifiée par analyse gravimétrique des fractions collectées. Les écarts relatifs obtenus ($(\Delta m - m_{\text{tot extraite}}) / \Delta m$) sont compris entre 8,6 et 53,1% dans le cas du tourteau de cameline. Dans le cas de la coquille Saint Jacques, on observe un excès de matière apparent (écart relatif entre le Δm et la matière totale extraite compris entre -56 et -11%). En ce qui concerne le résidu, il peut y avoir une perte de matière due à une volatilité des particules de granulométrie fine (au moins 8% de la charge a une taille de particules $\leq 200 \mu\text{m}$ dans le cas du tourteau de cameline) ou une adsorption du résidu sur les billes de sorte que la masse du résidu est sous-estimée ou, au contraire, une sur-estimation de la masse récupérée si une petite quantité de billes reste dans le résidu. En ce qui concerne les fractions, leur masse est calculée à partir de la masse présente dans un prélèvement de 4 mL et, rapportée ensuite au le volume total de la fraction. Les erreurs expérimentales peuvent provenir d'éthanol résiduel entraînant une surestimation de la masse extraite ou de la précision sur la détermination du volume des fractions ou du volume total (notamment à cause de la volatilité de l'éthanol).

Tableau 3.21 : Reproductibilité des extractions à taux fixe d'éthanol dans le réacteur de 100 mL
(Débit d'éthanol : 0,1 g.min⁻¹ (2% EtOH), 1,2 g.min⁻¹ (15% EtOH), 2,1 – 2,7 g.min⁻¹ (30% EtOH), n=2).

| Matrice | Protocole | Débit CO ₂ (g.min ⁻¹) | Temps d'extraction (min) | m _{chargée} (g) | m _{résidu} (g) | Δm (g) | m _{tot extraite} (g) | η_{global} |
|--------------------------------|-----------|---|--------------------------------|-----------------------------|----------------------------|-------------------|----------------------------------|------------------------|
| Cameline Bioplanète | 2% EtOH | 6,5 | 295 | 54,0 | 46,4 | 7,6 | 5,4 | 10,0% |
| | | 6,6 | 300 | 53,7 | 46,9 | 6,8 | 5,9 | 11,0% |
| | 30% EtOH | 5,0 | 254 | 57,8 | 49,0 | 8,8 | 6,4 | 11,1% |
| | | 6,0 | 280 | 55,9 | 46,5 | 9,4 | 6,7 | 12,0% |
| Coquille St Jacques | 15% EtOH | 6,7 | 300 | 37,0 | 33,8 | 3,2 | 5,0 | 13,5% |
| | | 6,5 | 297 | 35,8 | 31,4 | 4,4 | 4,9 | 13,7% |

m : masse ; Δm = différence de masse entre la charge et le résidu ; η_{global} : rendement global.

Le rendement global d'extraction est toujours calculé à partir de la masse totale extraite. En termes de reproductibilité sur ce rendement, un écart de 1 point sur la valeur est observé, ce qui semble raisonnable. Pour les rendements en lipides totaux et phospholipides (Tableau 3.22), ils diffèrent de moins de deux points, à l'exception du rendement en phospholipides pour les extractions réalisées avec 2% d'éthanol. L'écart de dix points peut s'expliquer par la variété engendrée lors de la prise d'échantillonnage. En effet, les phospholipides représentent entre 6,3 à 10,4% mass des lipides totaux du tourteau de cameline Bioplanète. La moyenne en phospholipides a pour valeur $9,4 \pm 2,2\%$ en poids de lipides totaux. Donc, cet écart de 10 points n'est pas significatif.

Tableau 3.22 : Rendements en lipides totaux et en phospholipides des extractions (n=2).

| Matrice | Protocole | LT _{charge} (g) | PL _{charge} (mg) | LT _{résidu} (g) | PL _{résidu} (mg) | η_{LT} | η_{PL} |
|--------------------------------|-----------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-------------|-------------|
| Cameline Bioplanète | 2% EtOH | 6,1 | 570 | 1,0 | 441 | 83% | 23% |
| | | 6,0 | 567 | 0,9 | 382 | 85% | 33% |
| | 30% EtOH | 6,7 | 633 | 1,7 | 675 | 91% | 81% |
| | | 6,3 | 595 | 0,8 | 512 | 90% | 80% |
| Coquille St Jacques | 15% EtOH | 4,7 | 558 | 0,8 | 323 | 82% | 42% |
| | | 4,6 | 540 | 0,9 | ND | 80% | ND |

LT : lipides totaux ; PL : phospholipides ; η_{LT} : rendement d'extraction des lipides totaux ; η_{PL} : rendement d'extraction des phospholipides ; ND : non déterminé.

En conclusion, un problème existe entre la matière totale extraite et la différence de masse entre la charge et le résidu. Une cause probable de ce problème vient notamment de la difficulté à récupérer et à trier le résidu des billes utilisées pour réaliser le lit alterné. Néanmoins, en termes de rendements d'extraction (globaux, lipides totaux ou phospholipides), la reproductibilité est satisfaisante, au regard des écarts déjà observés sur la composition de la matière première.

II.2.2 Extraction à teneur fixe en éthanol

L'effet de la présence ou non d'éthanol dans le fluide supercritique est visible sur l'aspect macroscopique du résidu récupéré après extraction. En effet, en présence d'éthanol, des lits compacts de matière sont récupérés (Figure 3.10.A), tandis qu'en absence d'éthanol, les lits s'effritent dès la sortie du réacteur (Figure 3.10.B).



Figure 3.10 : Aspect macroscopique du résidu de cameline à la sortie du réacteur en présence (A) et en absence d'éthanol (B) lors de l'extraction supercritique.

L'influence du pourcentage d'éthanol sur la cinétique d'extraction est présentée Figure 3.11. Il a été fait le choix de travailler avec un débit de CO₂ fixe à $6,3 \pm 0,5$ g.min⁻¹ et de calculer le débit d'éthanol en fonction du pourcentage souhaité dans le fluide supercritique. Avec un débit total qui croît, le temps de perçage de l'éthanol évolue de 30 à 10 min quand son taux dans le fluide varie de 2 à 30%.

Les collectes sont effectuées toutes les 60 minutes pour les pourcentages d'éthanol compris entre 0 et 15% d'éthanol. Pour les extractions à 30% d'éthanol, les cinq premières fractions sont collectées toutes les 17 ou 20 minutes (F0 à F4), temps correspondant à deux fois le temps de perçage du fluide (temps mis par le fluide CO₂ + EtOH pour traverser le système), puis toutes les 60 minutes (F5 et F6).

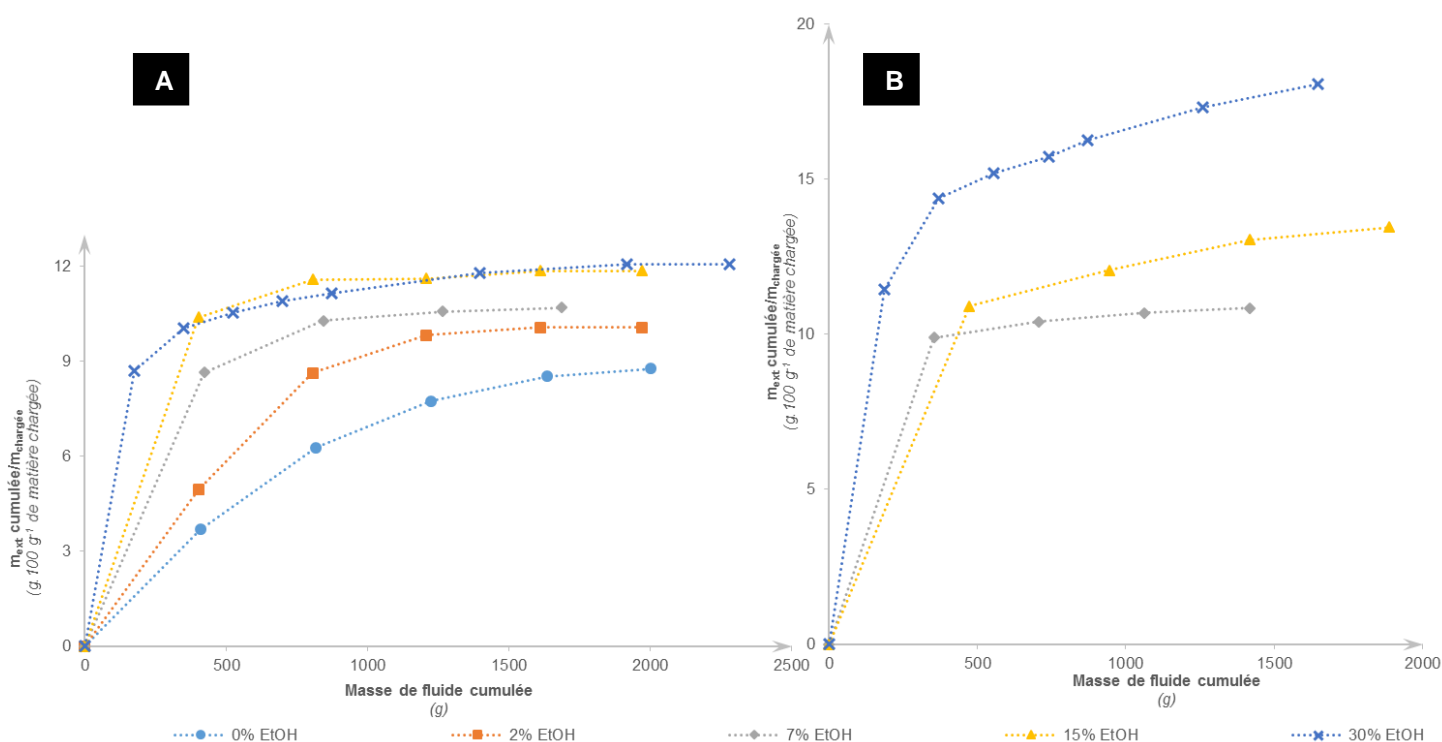


Figure 3.11 : Cinétique d'extraction à pourcentage d'éthanol fixe dans le fluide supercritique à partir du tourteau de cameline Bioplanète (A) et des sous-produits de la coquille Saint Jacques (B), dans le réacteur de 100 mL ($m_{chargée} = 52,5$ à $60,0$ g pour le tourteau de cameline, $m_{chargée} = 33,0$ à $37,0$ g pour la coquille Saint Jacques, débit CO₂ = $6,3 \pm 0,5$ g.min⁻¹).

L'augmentation du pourcentage d'éthanol dans le milieu extractant induit une augmentation de la matière totale extraite et cela pour les deux types de matrice, végétale et animale (Figure 3.11.A et B). Pour le tourteau de cameline, aucune différence n'est observée entre la courbe de 15% et de 30% d'éthanol. En effet, pour une même masse de fluide passée (environ 400 g), la matière totale extraite rapportée à la masse chargée est de 10 g.100 g⁻¹, et par la suite, les courbes se superposent parfaitement. Par ailleurs, toutes les premières fractions collectées (F0, au minimum) contiennent une phase huileuse. Dans le cas de la coquille Saint Jacques, l'augmentation de 15 à 30% d'éthanol induit une différence notable sur la quantité totale extraite, qui passe de 12 à 17 g.100g⁻¹ de charge à 1 500 g de fluide.

En termes de quantité de lipides extraits, la figure 3.12 montre l'impact du pourcentage d'éthanol sur les rendements d'extraction des LT et des PL, calculés d'après leurs teneurs dans les résidus. L'extraction des lipides totaux et des phospholipides au cours du temps ne peut pas être présentée, car toutes les fractions n'ont pas été analysées. Pour les lipides totaux de la cameline, 58% de ceux-ci sont extraits par le CO₂ pur (Figure 3.12.A). Ce pourcentage augmente à $84 \pm 1\%$ lorsque le fluide extractant contient 2% d'éthanol et atteint 90% avec 30% d'éthanol. Cet effet de la proportion d'éthanol sur le rendement en lipides totaux est différent pour la coquille Saint Jacques. En effet, à 7% d'éthanol, seuls 37% des lipides totaux sont extraits (contre 92% pour la cameline). Il faut atteindre 30% d'éthanol pour obtenir une extraction de 92% sur les lipides totaux (Figure 3.12.B). Cette amélioration de l'extraction des lipides avec la teneur en éthanol du fluide extractant est cohérente avec les résultats de la littérature. Par exemple, à 17,7 MPa et 33°C, 39% de lipides totaux sont extraits d'œufs de saumon par CO₂ + 5% EtOH (après 4h d'extraction). Avec un pourcentage d'éthanol de 20%, le rendement d'extraction des lipides totaux est de 98,8% (Tanaka et al., 2004).

La différence de comportement entre le tourteau de cameline et la coquille Saint Jacques peut être attribuée soit à leur accessibilité dans la matrice, soit à la nature des lipides et/ou à la longueur des chaînes d'acides gras. En effet, il a été montré que les triglycérides à chaînes d'acides gras longues sont moins solubles que les acides gras à chaînes courtes pour des pressions inférieures à 35 MPa en CO₂ pur (Hammam, 1992 ; Zaidul et al., 2007).

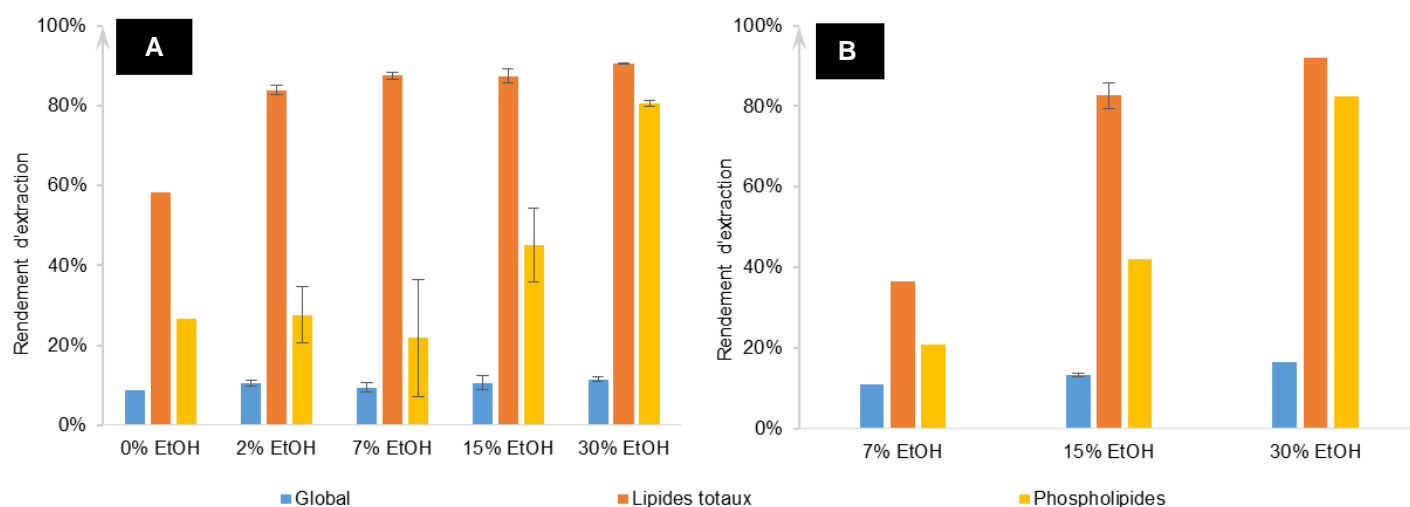


Figure 3.12 : Rendement d'extraction global, en lipides totaux et en phospholipides obtenus à partir d'extraction à pourcentage fixe d'éthanol pour la cameline Bioplanète (A) et la coquille Saint Jacques (B) ($m_{\text{chargée}} = 52,5$ à $60,0$ g pour le tourteau de cameline, $m_{\text{chargée}} = 33,0$ à 37 g pour la coquille Saint Jacques, débit CO₂ = $6,3 \pm 0,5$ g.min⁻¹).

La présence d'éthanol agit aussi sur la solubilité des phospholipides (lipides polaires). Avec 30% d'éthanol dans le mélange extractant, 81 à 82% des phospholipides présents dans la cameline ou la coquille Saint Jacques sont extraits, alors qu'à 7% d'éthanol, seulement 21 à 22% des phospholipides présents dans la charge sont extraits. Dans la littérature, l'extraction est généralement réalisée avec des proportions d'éthanol de l'ordre de 10%, comme dans la publication de Dunford et Temelli (1995). A partir de graines de colza (désuillées ou non), des phospholipides sont extraits pour un

pourcentage molaire d'éthanol de 9,5 (P/T : 55,2 MPa/45°C). Cependant, le rendement d'extraction en PL est de 8%, ce qui est environ 3 fois plus faible que ceux trouvés ici. Plusieurs explications sont possibles :

- la durée de l'extraction. Dans le cas de la publication, la durée de l'extraction est de 3 h contre 4 h dans notre cas ;
- la disposition dans le réacteur ;
- la granulométrie des particules.

Pour 15% d'éthanol dans le fluide, moins de 50% des phospholipides sont extraits, car le pouvoir solvant n'est pas suffisant. L'ajout d'éthanol au CO₂ lui confère un caractère de plus en plus polaire, ce qui augmente la solubilité des espèces et donc la quantité extraite. Pour résumer, avec 30% d'éthanol dans le fluide, plus de 90% des lipides totaux et 80% des phospholipides présents dans la matrice sont extraits.

II.2.3 Pureté en lipides totaux et en phospholipides des fractions supercritiques

II.2.3.1 Cas des sous-produits de la coquille Saint Jacques

La répartition des lipides totaux au cours des extractions à partir de la coquille Saint Jacques est présentée figure 3.13. Pour chaque fraction, les quantités de lipides totaux et de phospholipides sont mesurées par extraction Folch et RMN ³¹P, respectivement. De plus, la masse totale de la fraction (après évaporation de l'éthanol) est mesurée par pesée. Les histogrammes représentent ces trois masses. Les teneurs affichées sur chaque fraction correspondent à la teneur en lipides totaux de la fraction. Ainsi par exemple, pour l'extraction à 15% EtOH dans le fluide extractant, la fraction F0 est constituée de 62% de lipides totaux, dont 6% sont des phospholipides. Cependant, les PL ne représentent que 4% de la masse de la fraction. Quant à la matière non-lipidique, elle représente 38% (100-62) de la masse de la fraction. Ces histogrammes peuvent donc être analysés de deux façons :

- suivant la répartition des lipides dans les différentes fractions (équivalent à une cinétique d'extraction) ;
- suivant la richesse d'une fraction donnée en lipides totaux et/ou phospholipides, autrement dit, en termes de pureté des fractions en lipides ou PL.

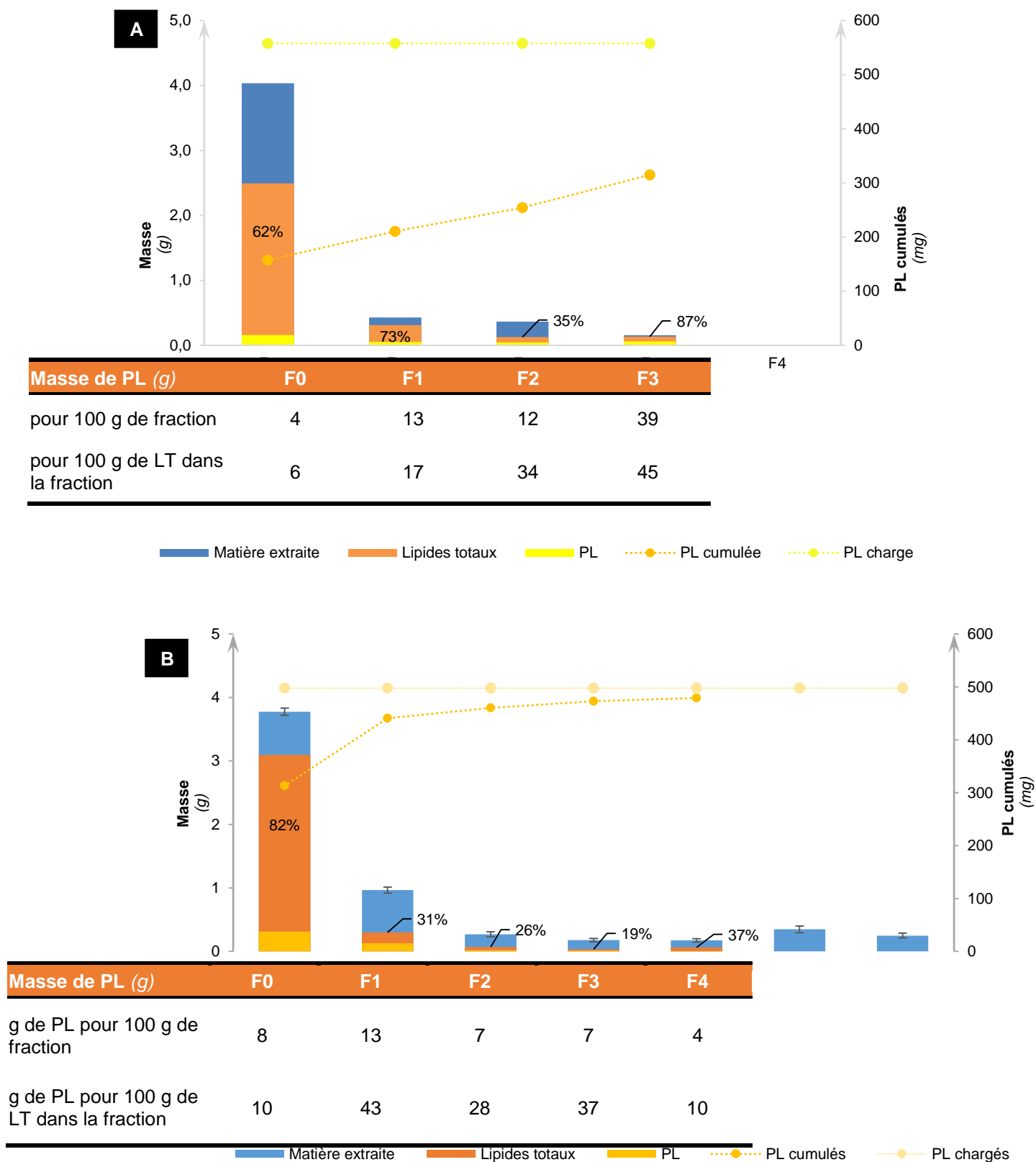


Figure 3.13 : Répartition des lipides totaux et des phospholipides dans les fractions au cours de l'extraction : A : à 15% EtOH (EFS St Jacques 8, débit de $\text{CO}_2 = 6,7 \text{ g.min}^{-1}$) ; B : à 30% EtOH (EFS St Jacques 11, débit de $\text{CO}_2 = 6,5 \text{ g.min}^{-1}$) dans le réacteur de 100 mL.

Dans le cas de l'extraction réalisée à 15% EtOH (Figure 3.13.A), les lipides totaux sont essentiellement extraits au cours des 60 premières minutes de l'extraction (F0), avec une quantité de l'ordre de 2,5 g. Les quantités extraites diminuent notablement dans les fractions suivantes, puisqu'elles sont de l'ordre de 0,3 g dans F1 puis 0,1 g dans F2 et F3. Ainsi, 81% des lipides totaux extraits se trouvent dans la fraction F0. Dans cette fraction, les lipides totaux représentent environ 62% en poids dont seulement à 4% sont des PL. Il en résulte que des composés de nature non lipidique sont co-extraits dans ces conditions (38% du poids de la fraction F0). En résumé, la composition de la fraction F0 peut être décomposée comme suit :

- 4% de PL
- 58% de lipides autres que des phospholipides
- 38% de composés de nature non lipidique.

En termes de pureté en PL qui sont les composés d'intérêt, cette fraction n'est donc pas satisfaisante. Malgré tout, la plus grande quantité de PL extraite se trouve en F0. En effet, 50% de la totalité des PL extraits (160 mg) sont extraits en 1 h avec 15% d'éthanol dans le CO₂. La poursuite de l'extraction au-delà d'une heure permet de continuer à extraire une quantité régulière de PL (courbe en pointillé orange, échelle de droite sur le graphe), alors que l'extraction des autres lipides et des espèces non lipidiques ralentit. En conséquence, la dernière fraction analysée F3 est la plus pure en PL (39% du poids de l'extrait sec) mais avec des quantités extraites bien plus faibles qu'en F0, de l'ordre de 60 mg. La fraction F3 correspond à 4 h d'extraction en CO₂ + 15% d'EtOH, et est collectée entre 1,4 et 1,9 kg de fluide.

Dans le cas d'une extraction menée avec 30% d'éthanol dans le fluide extractant (Figure 3.13.B), les extraits sont collectés toutes les 20 min de F0 à F4 (contre 60 min pour les collectes de l'extraction à 15% d'EtOH). On a donc plus de précision sur la cinétique d'extraction des lipides totaux et des phospholipides. Clairement, le graphe montre que les lipides totaux et les PL sont essentiellement extraits en F0 et F1, soit après 40 minutes d'extraction et moins de 0,4 kg de fluide extractant. Pour les phospholipides, environ 300 mg sont extraits en 20 minutes (F0), puis 130 mg supplémentaires au cours des 20 minutes suivantes (F1). La poursuite de l'extraction au-delà de 40 minutes conduit à extraire moins d'une cinquantaine de milligrammes supplémentaires de PL. Ainsi, augmenter la proportion d'éthanol dans le mélange de 15 à 30% permet de concentrer l'extraction des PL dans les premières 40 minutes de l'extraction au lieu d'avoir une extraction plus régulière dans le temps mais alors répartie sur davantage de fractions. Un même effet est observé sur les lipides totaux qui vont se trouver essentiellement présents en F0 et F1 (3,4 g extraits en F0+F1 sur 3,9 g totaux), alors que l'extraction des composés non-lipidiques (portion bleue sur les histogrammes) est plus régulière. En conséquence, la fraction F0 est maintenant constituée à 82% de lipides et donc de 18% de molécules non-lipidiques. Augmenter la teneur en éthanol et fractionner toutes les 20 minutes a permis d'obtenir une fraction plus pure en phospholipides (F1) qui représentent 13% en poids de la fraction (150 mg) et 43% des lipides présents dans la fraction. La composition globale de cette fraction F1, se répartit en :

- 13% de PL
- 18% de lipides non phosphorés (31 – 13%)
- 69% de composés non lipidiques (100-31%)

Cette analyse de composition peut être menée sur toutes les fractions obtenues à partir de la coquille Saint Jacques pour des pourcentages d'éthanol dans le fluide extractant de 15 et 30% (Tableau 3.24).

Tableau 3.23 : Composition en phospholipides, en lipides non phosphorés et autres molécules non-lipidiques des fractions issues de l'extraction des sous-produits de la coquille Saint-Jacques.

| Extraction | % EtOH | Fraction | Temps de la collecte (min) | Masse de fluide passée (g) | Composition de la fraction (%mass) | | | |
|--------------------------|--------|----------|----------------------------|----------------------------|------------------------------------|------------------------|-------------------------|----------------------|
| | | | | | PL | Lipides non phosphorés | Composés non-lipidiques | m _{PL} (mg) |
| EFS St Jacques 8 | 15 | F0 | 60 | 0 - 472 | 4 | 58 | 38 | 157 |
| | | F1 | 60 | 472 - 944 | 13 | 61 | 27 | 53 |
| | | F2 | 60 | 944 - 1 416 | 12 | 23 | 65 | 44 |
| | | F3 | 60 | 1 416 - 1 888 | 39 | 48 | 13 | 60 |
| EFS St Jacques 11 | 30 | F0 | 20 | 0 - 185 | 8 | 74 | 18 | 313 |
| | | F1 | 20 | 185 - 370 | 13 | 18 | 69 | 128 |
| | | F2 | 20 | 370 - 555 | 7 | 19 | 74 | 19 |
| | | F3 | 20 | 555 - 740 | 7 | 12 | 81 | 13 |
| | | F4 | 20 | 740 - 925 | 4 | 33 | 63 | 6 |

EFS : extraction par fluide supercritique ; EtOH : éthanol ; PL : phospholipide ; m : masse.

A travers ces deux exemples d'extraction, on constate que la pureté en PL et la quantité extraite de PL sont difficilement compatibles (Tableau 3.23). Suivant les applications visées, on privilégiera une fraction riche en PL mais de faible pureté. Par exemple, la fraction F0 extraite avec 30% EtOH a une pureté en PL faible (8%), mais contient environ 313 mg de PL. On peut aussi préférer une fraction appauvrie en lipides phosphorés mais plus pure en PL comme la fraction F3 obtenues avec 15% EtOH.

II.2.3.2 Cas du tourteau de cameline

La répartition des lipides totaux au cours des extractions à partir du tourteau de cameline est présentée figure 3.14. Contrairement à la coquille Saint Jacques, la teneur en LT dans les fractions n'a pas été dosée par une extraction de Folch, mais simplement par pesée de la phase huileuse (assimilée à la masse de lipides totaux). Dans les extractions réalisées à 15% et 30% d'éthanol, la fraction huileuse n'est visible que pour la fraction F0. Comme pour l'étude à partir de la coquille Saint Jacques, les histogrammes de la figure 3.14 représentent la masse totale extraite dans la fraction, la phase huileuse « lourde » quand elle est présente ainsi que la quantité de PL dosée seulement dans les deux premières fractions (F0 et F1) par RMN ^{31}P . La teneur affichée sur la fraction F0 correspond à la teneur en lipides totaux de la fraction. Ainsi, pour l'extraction à 15% EtOH dans le fluide extractant, la fraction F0 est constituée de 78% de lipides totaux, dont 10% sont des phospholipides (soit 8% de la masse totale totale de F0). Quant à la matière non-lipidique, elle représente 22% (100-78) de la masse de la fraction (Tableau 3.24). Pour la fraction F1, la seule donnée que nous déterminons est la pureté en PL, soit 28% de la masse totale. Cette pureté est nettement supérieure à celle de la fraction F0, mais cela est contre balancé par la quantité de PL extraits (66 mg au lieu de 93 mg dans la fraction F0).

Dans le cas d'une extraction menée avec 30% d'éthanol dans le milieu, les extraits sont collectés toutes les 20 minutes (de F0 à F4). Contrairement à la coquille saint Jacques, les lipides totaux sont uniquement extraits dans la fraction F0, tandis que les PL sont détectés dans la fraction F1 (16% de la masse de la fraction). Pour les PL, 159 mg sont extraits en 40 min, contre 160 mg après 2 h d'extraction à 15% d'éthanol : une concentration en PL dans les 40 premières minutes de l'extraction voir entre les vingtièmes et quarantièmes minutes d'extraction a eu lieu lors de l'augmentation du pourcentage d'éthanol dans le fluide. Tout comme pour la coquille Saint Jacques, augmenter la proportion d'éthanol et fractionner toutes les 20 minutes permet aussi d'obtenir une fraction plus pure en PL (F1). La composition des fractions F0 et F1 est présentée dans la figure 3.14 et le tableau 3.24 pour les pourcentages d'éthanol de 15 et 30%.

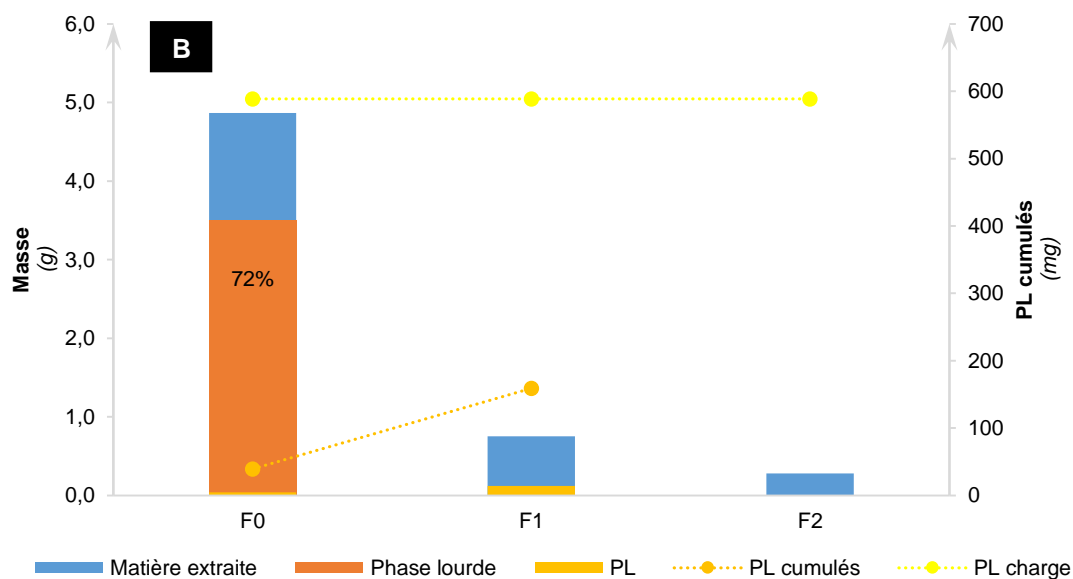
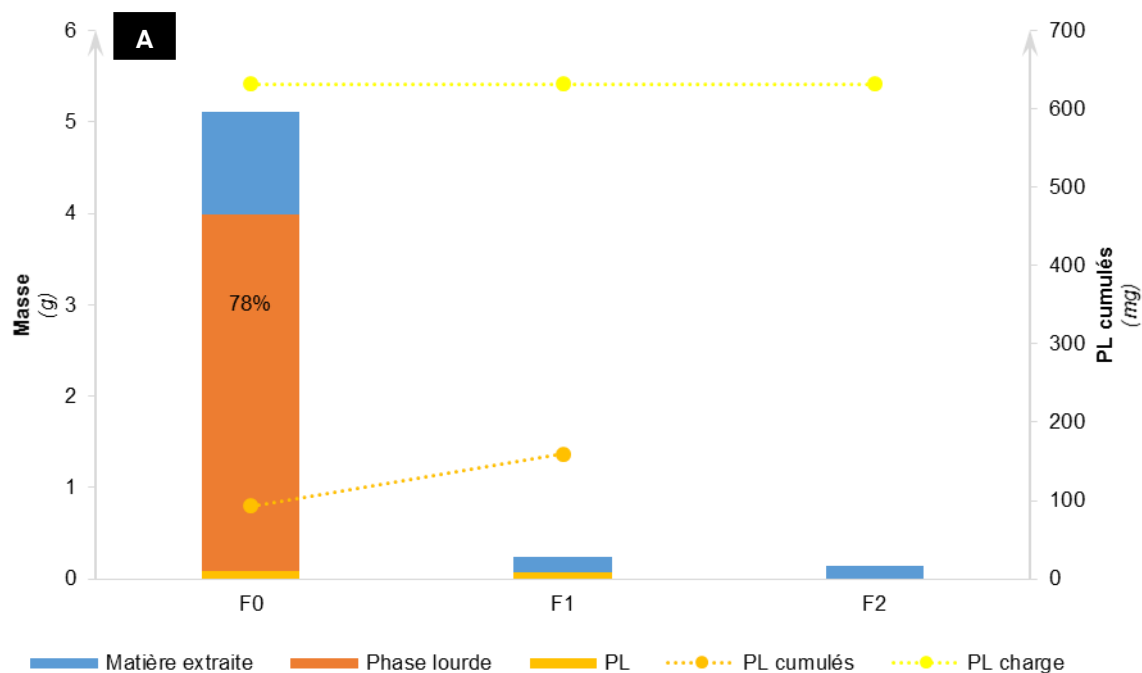


Figure 3.14 : Répartition des lipides totaux et des phospholipides sur les premières fractions de l'extraction à 15% d'éthanol (A) (EFS Cameline 2, débit de $\text{CO}_2 = 6,5 \text{ g.min}^{-1}$) et à 30% d'éthanol (B) (EFS Cameline 6, débit de $\text{CO}_2 = 6,0 \text{ g.min}^{-1}$).

Tableau 3.24 : Composition en PL, lipides non phosphorés et autres molécules non lipidiques dans les extractions à taux fixe d'éthanol à partir du tourteau cameline Bioplanète.

| Extraction | % EtOH | Fraction | Temps de la collecte (min) | m _{fluide} passée (g) | Composition de la fraction (%mass) | | | m _{PL} (mg) |
|-----------------------|--------|----------|----------------------------|--------------------------------|------------------------------------|------------------------|-------------------------|----------------------|
| | | | | | PL | Lipides non phosphorés | Composés non-lipidiques | |
| EFS Cameline 2 | 15 | F0 | 60 | 0 - 466 | 8 | 70 | 22 | 93 |
| | | F1 | 60 | 466 - 932 | 28 | ND | ND | 66 |
| EFS Cameline 6 | 30 | F0 | 20 | 0 - 174 | 3 | 69 | 28 | 39 |
| | | F1 | 20 | 174 - 349 | 16 | ND | ND | 120 |

EtOH : éthanol ; PL : phospholipide ; m : masse ; EFS : extraction par fluide supercritique ; ND : non déterminé.

II.2.4 Conclusion de l'extraction à taux fixe d'éthanol

Les résultats précédents montrent que l'utilisation d'un mélange à 30% d'éthanol dans le fluide extractant permet d'extraire environ 80% des phospholipides présents dans les deux matrices (Figure 3.12). La diminution de la proportion d'éthanol dans le milieu extractant conduit à répartir plus régulièrement les PL au cours du temps et dans les fractions, mais pénalise la quantité récupérée dans les fractions. Pour le tourteau de cameline comme pour la coquille Saint Jacques, des PL sont extraits à hauteur d'environ 20% de la quantité présente dans la charge avec une teneur de 7% d'éthanol.

Les lipides non phosphorés et les espèces non lipidiques répondent différemment aux proportions d'éthanol dans le milieu. Si les quantités globales extraites peuvent être du même ordre de grandeur à 15 et 30% par exemple pour la coquille Saint Jacques, les cinétiques d'extraction sont différentes (Figure 3.13). Un fractionnement dans le temps à proportion variable d'éthanol peut donc être envisagé comme moyen pour modifier la composition des fractions.

Ainsi, pour augmenter la pureté des phospholipides vis-à-vis des autres lipides dans le but de formuler des liposomes, nous allons développer un protocole en deux étapes : la première visant à extraire majoritairement les lipides autres que les phospholipides, la seconde visant à récupérer les phospholipides. D'après les rendements obtenus à taux d'éthanol fixe (Figure 3.13), 80% des LT sont extraits dès 7% d'éthanol dans le fluide, dans le cas de la cameline. Pour la coquille Saint Jacques, ces 7% d'éthanol extraient seulement 40% de LT, mais augmenter la proportion c'est aussi augmenter le risque de co-extraire les PL. D'ailleurs, les résultats ont montré que 20% des phospholipides sont extraits avec 7% d'éthanol (après 4 h d'extraction). Pour limiter leur extraction dans les premières fractions, le temps de cette première étape sera donc réduit à 2 h.

II.3 EXTRACTION DES PHOSPHOLIPIDES AVEC GRADIENT D'ETHANOL ET LE REACTEUR DE 100 ML

L'extraction est réalisée en deux étapes :

- une étape menée à 7% d'éthanol (composition du fluide extractant CO₂:EtOH 93:7) avec la collecte de deux fractions F₀ et F₁ d'une heure chacune ;
- une étape à 27% d'éthanol pendant 1 h 10 d'extraction répartie en quatre fractions de F₂ à F₅ (collecte de 20 minutes par fraction) ;
- une étape de séchage en CO₂ pur d'une heure environ (F₆).

Lors des extractions avec gradient d'éthanol, le débit en CO₂ reste constant, seul le débit d'éthanol est modifié.

II.3.1 Reproductibilité des extractions

La reproductibilité des résultats d'extraction obtenus avec gradient d'éthanol est étudiée avec le tourteau de cameline Iterg. La courbe de cinétique d'extraction se décompose en quatre parties (Figure 3.15). Les deux premières, menées à un taux fixe d'éthanol de 7%, correspondent à l'extraction des composés les plus disponibles, suivies d'un ralentissement dû à l'épuisement progressif de la matrice et/ou à un transfert de matière plus lent. Au changement du pourcentage d'éthanol (27% EtOH), une reprise de l'extraction est observée : l'augmentation d'éthanol solubilise d'autres molécules. Puis, l'extraction se ralentit suite à l'importance du transfert intraparticulaire et/ou à un appauvrissement de la matière. Au cours du procédé d'extraction, la coloration des fractions est modifiée (Figure 3.15). Entre F₀ et F₁ les fractions s'éclaircissent. Néanmoins, suite à l'augmentation du taux d'éthanol, une fraction orangée de couleur plus intense que F₀ et F₁ est récupérée. Les fractions suivantes s'éclaircissent.

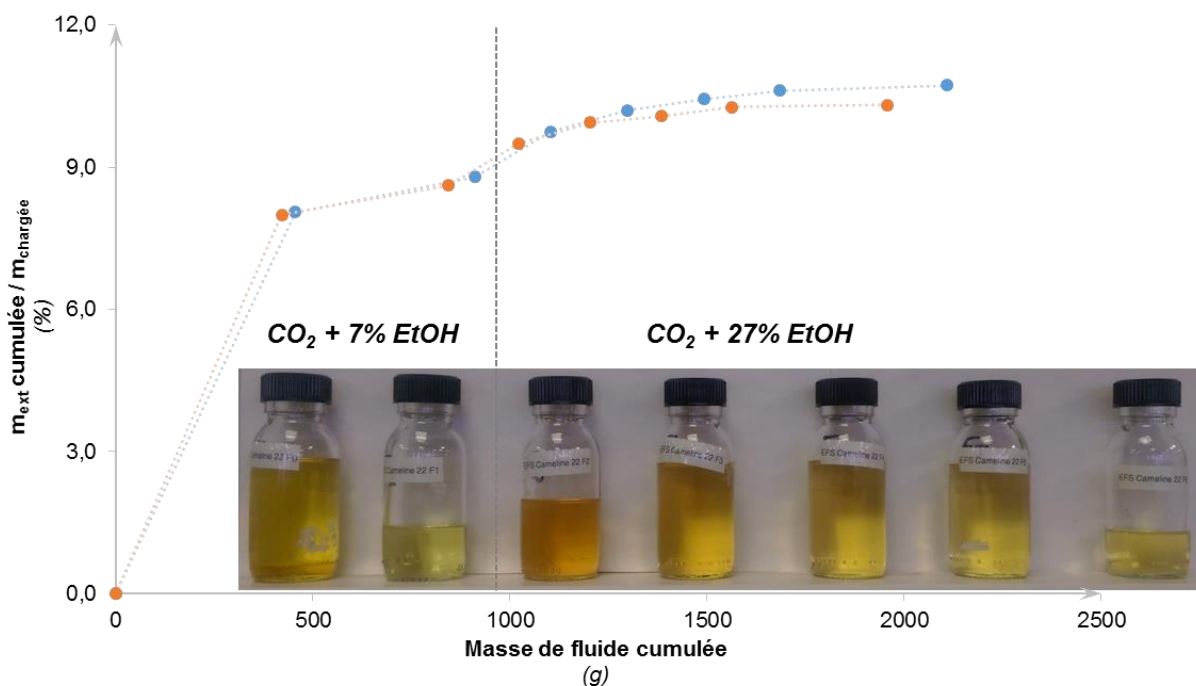


Figure 3.15 : Cinétique d'extraction obtenue à partir de la cameline Iterg (EFS Cameline 19, $m_{\text{chargée}} = 46,4 \text{ g}$; EFS Cameline 23, $m_{\text{chargée}} = 43,2 \text{ g}$) ($P = 25 \text{ MPa}$, $T = 45^\circ\text{C}$, débit $\text{CO}_2 = 7,0 \pm 0,1 \text{ g.min}^{-1}$, $n=2$).

Le tableau 3.25 présente les principales caractéristiques et les rendements d'extraction obtenus pour les deux expériences. L'écart entre le Δm (charge – résidu) et la masse totale de matière extraite est inférieur à 10%. Il est principalement dû à l'erreur sur les prélèvements. En effet, la méthode de récupération du résidu a été améliorée par l'utilisation d'un tamis. Les rendements globaux et les rendements d'extraction en phospholipides sont répétables. Le rendement en lipides totaux présente une différence de 10 points entre les deux extractions. La différence peut être imputable à l'erreur de 15% sur le dosage des lipides totaux dans la matrice.

Tableau 3.25 : Répétabilité des extractions avec gradient d'éthanol ($n=2$, EFS Cameline 19 et EFS Cameline 23). A : Conditions opératoires de l'extraction et rendement global ; B : Masses et rendements d'extraction en lipides totaux et en phospholipides.

A : Conditions opératoires de l'extraction et calcul du rendement global.

| Matrice | Protocole / Réacteur | Débit CO ₂ (g.min ⁻¹) | Temps d'extraction (min) | m _{chargée} (g) | m _{résidu} (g) | Δm (g) | m _{totale extraite} (g) | η_{global} |
|-----------------------|----------------------|--|--------------------------|--------------------------|-------------------------|----------------|----------------------------------|-----------------|
| Cameline Iterg | Gradient / 100 mL | 7,1 | 260 | 46,4 | 41,7 | 4,7 | 5,0 | 10,7% |
| | | 6,9 | 260 | 43,2 | 38,3 | 4,9 | 4,5 | 10,3% |

B : Masses et rendements d'extraction en LT et PL.

| Matrice | Protocole / Réacteur | LT _{chargée} (g) | PL _{chargée} (mg) | LT _{résidu} (g) | PL _{résidu} (mg) | η_{LT} | η_{PL} |
|-----------------------|----------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|-------------|-------------|
| Cameline Iterg | Gradient / 100 mL | 4,5 | 414 | 0,6 | 201 | 87% | 51% |
| | | 4,2 | 385 | 1,0 | 168 | 77% | 56% |

η_{global} : rendement global ; η_{LT} : rendement d'extraction des lipides totaux ; η_{PL} : rendement d'extraction des phospholipides ; ND : non déterminé ; m : masse.

II.3.2 Influence du gradient d'éthanol sur l'extraction et la pureté des phospholipides

L'effet du gradient d'éthanol sur l'extraction et la pureté en phospholipides est étudié sur les tourteaux de cameline (Bioplanète et Iterg) et sur les sous-produits de la coquille Saint Jacques. Dans ces essais, le dosage des PL est réalisé, pour l'essentiel, sur les fractions correspondant au changement du taux d'éthanol et à la fraction suivante. Dans le cas du tourteau de cameline Iterg et de la coquille Saint Jacques, ce changement intervient lors de la collecte de la fraction F2. Dans le cas du tourteau de cameline Bioplanète, ce dosage est étendu aux deux premières fractions (F0 et F1) ainsi qu'à la fraction F4. Les résultats de cet essai sont présentés en figure 3.17.

Dans cet essai EFS Cameline 10, comme dans les autres essais réalisés à partir de tourteaux de cameline, la fraction F0 se compose d'une phase éthanolique de couleur jaune et d'une phase huileuse visible à l'œil nu de couleur jaune-vert. La fraction F0 (1 h d'extraction à 7% EtOH, 419 g de fluide) correspond en général à plus de 60% de la masse totale extraite sur la durée totale de l'extraction. Dans l'exemple de la figure 3.17, cette fraction constitue 70% de la masse totale extraite et correspond à une masse de 4,3 g d'extrait. Les 30% d'extrait total restant se répartissent dans les fractions suivantes (essentiellement en F1 et F2), avec des quantités qui restent bien inférieures au gramme. Pour les deux types de matrice (animale et végétale), la fraction F1 représente entre 3 et 9% de la matière totale extraite. Pour le tourteau de cameline, une phase huileuse peut encore être présente dans cette fraction et correspondre jusqu'à 71% du poids de la fraction (ici la fraction lourde

représente 66% de la fraction). La fraction F2, qui correspond au changement de pourcentage d'éthanol dans le fluide, contient une quantité de matière supérieure ou égale à celle de la fraction F1 avec cependant un temps de collecte inférieur (20 min versus 60 min). Une reprise de l'extraction peut être considérée, si l'on tient compte de la quantité extraite par rapport à la masse de fluide utilisée. La fraction F2 semble être de nature différente. En effet, aucune phase huileuse n'est visible dans la fraction F2 et un changement de couleur de l'extrait y est observé pour les deux types de matrice. Dans l'exemple présenté, cette fraction est de couleur orangée tandis que les deux premières fractions sont de couleur jaune tirant vers le vert (Figure 3.14). Pour la coquille Saint Jacques, les deux premières fractions (F0 et F1) se caractérisent par une couleur vert kaki, puis suite à l'augmentation de l'éthanol, la couleur de la fraction F2 s'assombrit tirant vers le noir.

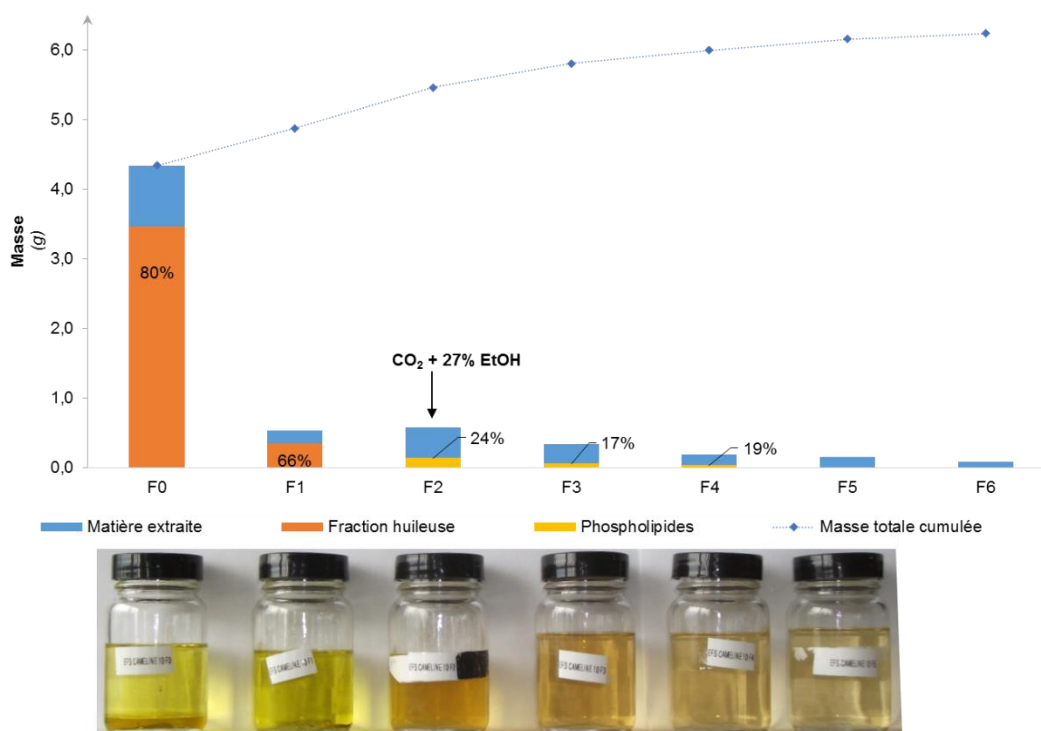


Figure 3.16 : Répartition des masses extraites dans les différentes fractions au cours d'une extraction avec gradient d'éthanol à partir du tourteau de cameline Bioplanète ($P = 25 \text{ MPa}$, $T = 45^\circ\text{C}$, débit $\text{CO}_2 = 6,5 \text{ g.min}^{-1}$, EFS Cameline 10).

L'analyse par RMN ^{31}P des fractions F0 à F4 de EFS Cameline 10 met en évidence la présence de PL principalement dans la fraction F2 (Figure 3.17). Avec une quantité de 138 mg, les PL représentent 24% en poids de cette fraction (après évaporation de l'éthanol). Dans les fractions suivantes, la quantité de PL diminue progressivement (60 et 37 mg de PL, respectivement dans les fractions F3 et F4). Les fractions F0 et F1, obtenues avec 7% d'éthanol, ne contiennent pas de PL. Ce résultat diffère du résultat observé précédemment à taux fixe d'éthanol. En effet, le dosage des PL dans le résidu

avait permis de calculer un rendement d'extraction de phospholipides de 20% avec 7% d'éthanol. Cette différence peut être imputée au temps d'extraction, qui est de 2 h dans le cas du protocole avec gradient contre 4 h pour l'extraction à taux fixe. La réduction de la durée de cette première étape d'extraction permettrait de concentrer les PL dans les fractions d'intérêt.

L'objectif du gradient d'éthanol était d'améliorer la pureté des fractions en phospholipides, avec notamment une meilleure séparation entre les PL et les autres lipides. Dans l'exemple du tourteau de cameline illustré figure 3.16, les PL sont extraits dans les fractions F2 et F3, alors que les autres lipides, assimilés à la phase lourde, sont essentiellement dans les fractions F0 et F1. Le gradient a donc bien permis cette séparation. On a ainsi obtenu deux fractions particulières,

- F0, constituée à 80% de lipides (assimilés à des lipides autres que les phospholipides) et 20% de composés non lipidiques
- F2 constituée à 24% de PL et à 76% de composés non lipidiques.

La pureté en phospholipides des fractions F2 (et même F3 et F4) obtenues au cours des extractions de tourteau de cameline et de coquille Saint Jacques dans le réacteur de 100 mL est donnée dans le tableau 3.26. Suites aux analyses réalisées sur les fractions EFS Cameline 10, il a été décidé d'analyser uniquement les fractions F2 et F3 et les résidus par RMN ^{31}P . Dans ce tableau, les extractions sont réalisées pour un débit et un gradient en éthanol identique. De plus, seule l'extraction EFS cameline 10 est réalisée sur le tourteau de cameline Bioplanète, les autres se rapportant au tourteau fourni par l'Iterg. Nous avons voulu rassembler les résultats des fractions analysées dans un même tableau afin d'avoir un bilan global de la pureté des fractions obtenues. Ainsi pour chaque extraction, la fraction F2 correspond à une masse extraite de PL plus importante que dans les fractions suivantes. En effet, la différence de masse de PL entre la fraction F2 et F3 (fractions collectées sur une même durée) est comprise entre 61 et 238 mg pour la cameline et est de 172 mg pour la coquille Saint Jacques. De plus, la fraction F2 a une pureté en phospholipides comprise entre 24 et 51%, pureté plus élevée que les fractions suivantes.

Tableau 3.26 : Pureté en phospholipides des fractions F2, F3 et F4 obtenues suite au protocole avec gradient d'éthanol à partir des trois matrices.

| Extraction | Fraction F2 | | Fraction F3 | | Fraction F4 | |
|-------------------|-------------------------|---|-------------------------|---|-------------------------|---|
| | m _{PL} (mg) | Pureté en PL dans la fraction (%) | m _{PL} (mg) | Pureté en PL dans la fraction (%) | m _{PL} (mg) | Pureté en PL dans la fraction (%) |
| EFS Cameline 10 | 138 | 24 | 60 | 17 | 37 | 19% |
| EFS Cameline 17 | 149 | 37 | 72 | 17 | | |
| EFS Cameline 18 | 314 | 38 | 76 | 23 | | |
| EFS Cameline 19 | 157 | 35 | 46 | 22 | 17 | 16% |
| EFS Cameline 20 | 263 | 41 | 80 | 30 | | |
| EFS Cameline 21 | 83 | 38 | 22 | 15 | | |
| EFS Cameline 22 | 195 | 48 | 46 | 23 | | |
| EFS Cameline 23 | 198 | 51 | 74 | 40 | | |
| EFS St Jacques 13 | 311 | 38 | 139 | 20 | | |

EFS : extraction par fluide supercritique ; m : masse ; PL : phospholipides.

Afin de confirmer la présence majoritaire des PL dans les fractions F2 et F3, un dosage des PL est aussi réalisé dans le résidu (charge après traitement supercritique) pour établir le bilan matière en PL entre la quantité initiale dans la charge et les PL récupérés dans les fractions F2, F3 et le résidu. Dans le cas des extractions à partir du tourteau cameline Iterg (Figure 3.17.B) et de la coquille Saint Jacques (Figure 3.17.C), la somme des quantités de PL extraits dans les deux fractions (entre 400 et 450 mg) et celle restant dans le résidu concordent relativement bien avec la masse moyenne de PL présents dans la charge (Figure 3.17.B et C). Dans le cas du tourteau de cameline Bioplanète, il pourrait rester des PL en faible quantité dans les autres fractions.

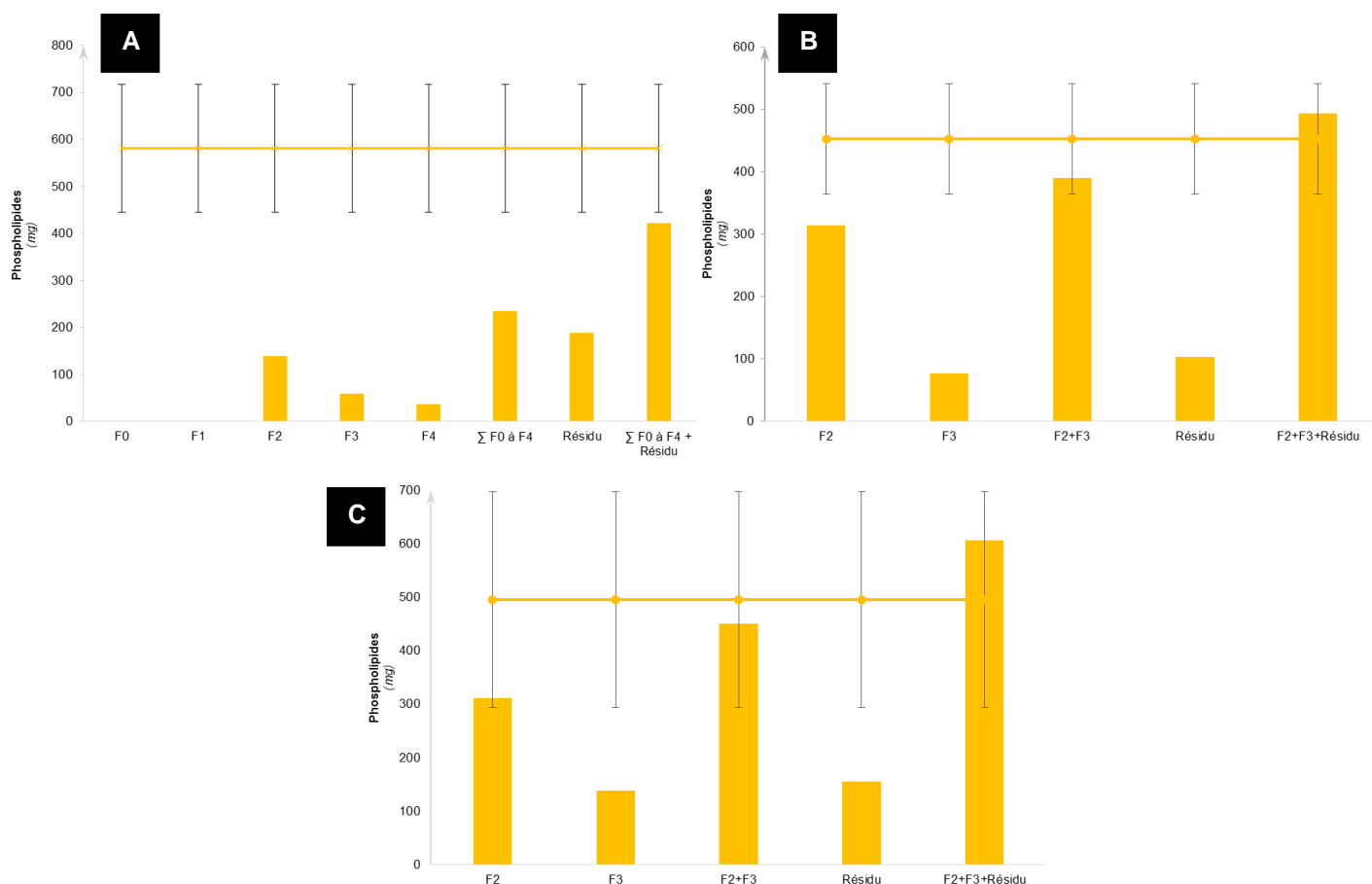


Figure 3.17 : Répartition des phospholipides dans les fractions F2 et F3 et dans le résidu au cours de l'extraction dans le réacteur de 100 mL ($P = 25 \text{ MPa}$, $T = 45^\circ\text{C}$, débit $\text{CO}_2 = 7,0 \pm 0,5 \text{ g.min}^{-1}$). A : cas du tourteau de cameline Bioplanète (EFS Cameline 10) ; B : cas du tourteau de cameline Iterg (EFS Cameline 18) ; C : cas des sous-produits de la coquille Saint Jacques (EFS St Jacques 13).

Les rendements en phospholipides obtenus lors des protocoles avec gradient d'éthanol (68 à 77%) sont inférieurs aux rendements obtenus à taux fixe d'éthanol 30% (81 à 82%). Les comparaisons s'effectuent entre EFS cameline 10 (gradient) et EFS cameline 1 et 6 (30% EtOH), ou EFS St Jacques 13 (gradient) et EFS St Jacques 11 (30% EtOH). Cette différence peut s'expliquer par :

- l'écart sur le pourcentage d'éthanol (27% dans le protocole gradient contre 30% dans le protocole à taux fixe).
- la durée de l'extraction à 27% d'éthanol (2h) contre celle à taux fixe d'éthanol (plus de 4h).

La première hypothèse est la plus probable. En effet, la corrélation entre le rendement en phospholipides et le pourcentage d'éthanol dans les essais réalisés à taux fixe en éthanol donne la formule suivante :

$$\eta_{\text{PL}} = 2,6 \times \% \text{EtOH} + 3,7 \cdot 10^{-2}.$$

Pour 27% d'éthanol dans le fluide extractant, on calcule un rendement d'extraction en PL théorique de 74%, valeur cohérente avec nos données expérimentales.

En termes de rendements globaux (Tableau 3.28), ceux obtenus pour l'extraction avec gradient d'éthanol sont dans les mêmes ordres de grandeur que ceux obtenus à composition en éthanol fixe. Pour les rendements en lipides totaux, ceux obtenus à partir des deux tourteaux de cameline sont supérieurs à 90%. Ces valeurs correspondent au rendement en lipides totaux obtenus lors des extractions avec 7% d'éthanol. Pour la coquille Saint Jacques, cette valeur correspond à celle obtenue lors de l'extraction à 15% d'éthanol.

Tableau 3.27 : Rendements obtenus pour les extractions par fluide supercritique avec gradient d'éthanol dans le réacteur de 100 mL ($P = 25$ MPa, $T = 45^\circ\text{C}$, débit $\text{CO}_2 = 7,0 \pm 0,5 \text{ g.min}^{-1}$).

| | EFS Cameline 10 (Bioplanète) | EFS Cameline 18 (Iterg) | EFS St Jacques 13 |
|----------------------------|---------------------------------|----------------------------|-------------------|
| η_{global} (%) | 11 | 11 | 18 |
| η_{LT} (%) | 92 | 91 | 84 |
| η_{PL} (%) | 68 | 77 | 69 |

EFS : extraction par fluide supercritique ; η_{LT} = rendement d'extraction en lipides totaux ; η_{PL} = rendement d'extraction en phospholipides.

II.3.3 Influence de différents paramètres opératoires autres que l'éthanol sur l'extraction des PL

Différents paramètres opératoires sont testés sur le tourteau de cameline Iterg pour un même protocole d'extraction avec gradient d'éthanol :

- la disposition de la matière dans le réacteur : lit continu sans garnissage de billes ou lit alterné. Au niveau industriel, la présence de billes ou d'un autre système de séparation pour faire des lits alternés entraîne un surcoût (second système de remplissage, séparateur de billes et de matière, etc ...) ;
- la présence de l'eau dans la matrice et/ou dans l'éthanol dans le but d'étudier si un faible pourcentage d'eau présent dans la matrice (entre 5 et 10%) ou dans l'éthanol (4%) influence l'extraction des lipides phosphorés (rappelons que toutes les autres extractions avec co-solvant ont été réalisées avec de l'éthanol à 96%) ;
- le diamètre des billes par rapport à la surface du réacteur dans l'éventualité de création de chemin préférentiel pour le fluide ;
- la masse de matière chargée.

Le tableau 3.28 présente les caractéristiques et les rendements d'extraction des différents essais. Tout d'abord, l'écart entre le Δm et la masse extraite est dans la majorité des cas inférieurs à 10% (Tableau 3.28.A). Pour l'extraction EFS cameline 20, l'écart relatif entre les deux valeurs est de 36% et s'explique par la difficulté à séparer le résidu des billes puisque la granulométrie du tourteau et le diamètre des billes sont du même ordre de grandeur ($< 500 \mu\text{m}$). Pour l'extraction EFS cameline 21,

l'écart relatif est de 20% et s'explique par la faible masse introduite (15 g) dans le réacteur. Dans le cas de l'EFS cameline 17, aucune explication n'est trouvée pour cet écart de 30%. Malgré ces quelques anomalies, les rendements globaux d'extraction sont du même ordre de grandeur dans les sept extractions, indiquant le peu d'influence des paramètres testés sur la quantité totale extraite.

Tableau 3.28 : Paramètres opératoires et rendements d'extraction à partir du tourteau de cameline Iterg ($P = 25 \text{ MPa}$, $T = 45^\circ\text{C}$, débit $\text{CO}_2 = 6,7 \pm 0,5 \text{ g.min}^{-1}$). A : Conditions opératoires de l'extraction et calcul du rendement global ; B : Masses et rendements d'extraction en lipides totaux et en phospholipides.

A : Principales caractéristiques des extractions étudiées et calcul du rendement global.

| N° | Type de lit | Ethanol | $\varnothing_{\text{billes}}$ (μm) | %eau charge | $m_{\text{chargée}}$ (g) | $m_{\text{résidu}}$ (g) | Δm (g) | m_{extraite} (g) | η_{global} (%) |
|----|-------------|---------|--|-------------|-----------------------------|----------------------------|-------------------|------------------------------|-------------------------------|
| 17 | alterné | Absolu | 2 000 | 5,3 | 53,9 | 46,6 | 7,4 | 5,1 | 10 |
| 19 | alterné | Absolu | 2 000 | 0,4 | 46,4 | 41,7 | 4,7 | 5,0 | 11 |
| 23 | alterné | Absolu | 2 000 | 0 | 43,2 | 38,3 | 4,8 | 4,5 | 10 |
| 18 | alterné | 96% | 2 000 | 5,3 | 50,7 | 44,9 | 5,8 | 5,3 | 11 |
| 20 | alterné | 96% | 450 - 500 | 5,7 | 49,1 | 41,8 | 7,3 | 4,7 | 10 |
| 21 | alterné | 96% | 2 000 | 5,1 | 15,6 | 13,6 | 2,0 | 1,6 | 10 |
| 22 | continu | 96% | 2 000 | 5,2 | 50,0 | 44,4 | 5,6 | 5,1 | 10 |

B : Rendements d'extraction en lipides totaux et en phospholipides.

| N° | $m_{\text{LT chargés}}$ (g) | $m_{\text{LT résidu}}$ (g) | η_{LT} (%) | $m_{\text{PL chargés}}$ (mg) | $m_{\text{PL résidu}}$ (mg) | η_{PL} (%) |
|----|--------------------------------|-------------------------------|---------------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------|
| 17 | 5,4 | 1,2 | 79 | 501 | 219 | 56 |
| 19 | 4,9 | 0,6 | 88 | 414 | 201 | 53 |
| 23 | 4,5 | 1,0 | 78 | 385 | 272 | 58 |
| 18 | 4,9 | 0,5 | 91 | 452 | 103 | 78 |
| 20 | 4,5 | 0,5 | 90 | 438 | 122 | 73 |
| 21 | 1,6 | 0,1 | 91 | 145 | 33 | 77 |
| 22 | 4,8 | 0,4 | 92 | 446 | 117 | 75 |

%eau charge : teneur en eau de la matière première chargée ; m : masse ; η_{global} : rendement d'extraction de matière totale extraite ; η_{LT} : rendement d'extraction de lipides totaux ; η_{PL} : rendement d'extraction de phospholipides.

En termes de lipides totaux, les extractions réalisées avec de l'éthanol 96% (EFS cameline 18, 20 et 22) présentent un rendement supérieur ou égal à 90% (Tableau 3.28.B), valeur supérieure aux rendements obtenus avec de l'éthanol absolu (78 à 88%). L'utilisation d'un lit continu de charge (EFS cameline 22 vs EFS cameline 18), l'utilisation d'un garnissage plus fin (EFS cameline 20 vs EFS cameline 18) ou une masse chargée divisée par 3 (EFS cameline 21 vs EFS cameline 18) n'a pas d'impact notable sur l'extraction globale des lipides totaux ou des phospholipides (rendement d'extraction compris entre 73 et 78%) (Tableau 3.28.B). Par contre, une baisse de 20 points du rendement en phospholipides est observée lors de l'utilisation de l'éthanol absolu. Enfin, l'influence de ces paramètres sur la pureté en phospholipides dans la fraction F2 (et F3) n'est pas concluant (Tableau 3.26). Quant à la quantité extraite de PL dans la fraction, seule la masse chargée l'influence : 83 mg de PL extraits pour une masse chargée de 15 g (EFS cameline 21) contre 314 mg de PL extraits pour une masse chargée de 51 g (EFS cameline 18).

Ainsi, la présence d'eau dans l'éthanol est le seul paramètre qui influence les rendements d'extraction en LT et PL par fluide supercritique. La présence de l'eau dans le co-solvant, entraîne une polarité plus élevée du milieu extractant, ce qui semble bénéfique pour l'extraction des phospholipides.

II.4 TRANSPOSITION DE L'EXTRACTION DES PHOSPHOLIPIDES DANS UN REACTEUR TUBULAIRE DE 490 mL

Le jeu d'expériences précédemment réalisées sur des lots de $49,8 \pm 4,1$ g pour le tourteau de cameline (Bioplanète et Iterg) et de 32,8 g pour les sous-produits de la coquille Saint Jacques sur un réacteur tubulaire de 100 mL a permis d'identifier les fractions riches en lipides non phosphorés (obtenues avec 7% d'éthanol) et celles contenant une quantité non négligeable de PL (obtenues avec 27% d'éthanol). Même si l'extraction des PL des matrices est satisfaisante (environ 80% des phospholipides initialement présents), les quantités extraites de l'ordre de 400 à 500 mg sont faibles pour les essais de formulation ultérieurs. Pour obtenir une masse plus importante de PL extraits, il est donc nécessaire d'augmenter la masse chargée. L'objectif ici est de transposer les résultats sur de plus grands volumes afin de :

- traiter des charges plus importantes (objectif de valorisation industrielle) ;
- réduire l'impact de la variabilité des lots sur les résultats ;
- produire un flux plus riche en phospholipides dans l'optique d'une production industrielle de lécithine ou la mise en forme continue de phospholipides en liposomes.

La transposition est réalisée avec un réacteur tubulaire de 490 mL ($\varnothing = 5$ cm et $h = 25$ cm). Ces modifications de dimension entraînent des changements dans la vitesse du fluide. Afin de maintenir un régime d'écoulement laminaire entre les deux réacteurs, le débit de CO_2 à imposer sera d'environ $10 \text{ g} \cdot \text{min}^{-1}$ (Annexe 1).

La transposition est abordée en considérant dans un premier temps l'extraction d'une même masse de matière que dans le réacteur de 100 mL pour la cameline (60 g) et pour la coquille Saint Jacques (30 g), puis ensuite en doublant cette charge dans le réacteur de 490 mL.

II.4.1 Extraction à partir d'une même quantité de charge

II.3.2.1 Cas du tourteau de cameline

La courbe de cinétique d'extraction obtenue dans le réacteur de 490 mL est comparée à celle obtenue dans le réacteur de 100 mL (Figure 3.18). La cinétique d'extraction garde un profil classique avec une reprise d'extraction qui suit le changement du pourcentage d'éthanol. Globalement, les deux courbes tendent vers la même masse totale extraite, de 11 g environ. Les courbes sont très voisines, sauf aux temps courts, où le volume mort du réacteur induit une différence dans le temps de perçage de l'extrait. Le temps de collecte pour le grand réacteur est resté le même que celui sur le réacteur de 100 mL, alors que le temps de perçage est passé de 17 à 24 min (Figure 3.18.A). Dans le cas de

l'extraction avec le réacteur de 100 mL, la durée de l'extraction à 7% d'éthanol est équivalente à plus de 6 fois le temps de perçage. Pour le réacteur à 490 mL, la durée de l'extraction à 7% d'éthanol est équivalente à trois fois le temps de perçage.

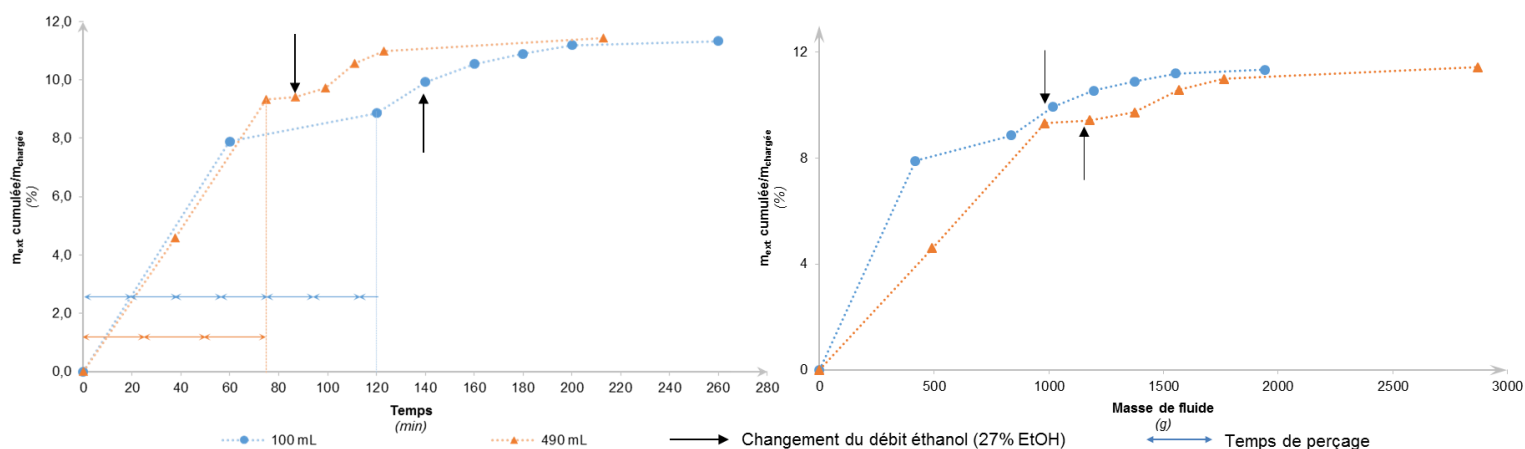


Figure 3.18 : Cinétique d'extraction pour une même masse chargée mais dans des réacteurs de volume différents ($P = 25 \text{ MPa}$, $T = 45^\circ\text{C}$). Réacteur de 100 mL : EFS Cameline 10, $m_{\text{chargée}} = 55 \text{ g}$, débit $\text{CO}_2 = 6,5 \text{ g}\cdot\text{min}^{-1}$. Réacteur de 490 mL : EFS Cameline 11, $m_{\text{chargée}} = 60 \text{ g}$, débit $\text{CO}_2 = 12,3 \text{ g}\cdot\text{min}^{-1}$. A : cinétique en fonction du temps ; B : cinétique en fonction de la masse de fluide.

En termes de répartition des lipides, les fractions F0 et F1 sont composées d'une phase huileuse qui représente 64 et 88% de la masse de leur fraction respective (Figure 3.19). L'analyse des phospholipides ne débute qu'à partir de la fraction F2, première fraction obtenue après le changement du débit d'éthanol. Dans cette fraction, des PL sont détectés en quantité très faible (3 mg), quantité qui augmente dans les fractions suivantes, respectivement 68 mg et 132 mg pour F3 et F4. Dans la distribution des PL observée en réacteur de 100 mL (EFS Cameline 10), les fractions F2 et F3 contenaient respectivement 138 et 60 mg de PL. Autrement dit, le passage au réacteur de 490 mL sans ajuster le temps de collecte au nouveau temps de perçage conduit à un 'glissement' du perçage des PL vers les fractions supérieures. Ce glissement s'opère aussi sur la masse totale extraite, ce qui atteste l'hypothèse du temps de collecte inadapté au temps de perçage. La fraction F2 correspond alors davantage à la collecte d'un extrait toujours en 7% d'éthanol, alors que la fraction F3 devient la fraction qui correspond à l'arrivée du fluide contenant réellement les 27% d'éthanol. Cela se traduit par une pureté en PL de 5 et 37% de la masse de la fraction F2 et F3 (respectivement), contre 24 et 17% de la masse de la fraction F2 et F3 (respectivement) dans le réacteur de 100 mL. Pour la fraction la plus riche en quantité de PL (F4, 132 mg), on a une pureté équivalente à la fraction la plus riche obtenue avec le réacteur de 100 mL (138 mg).

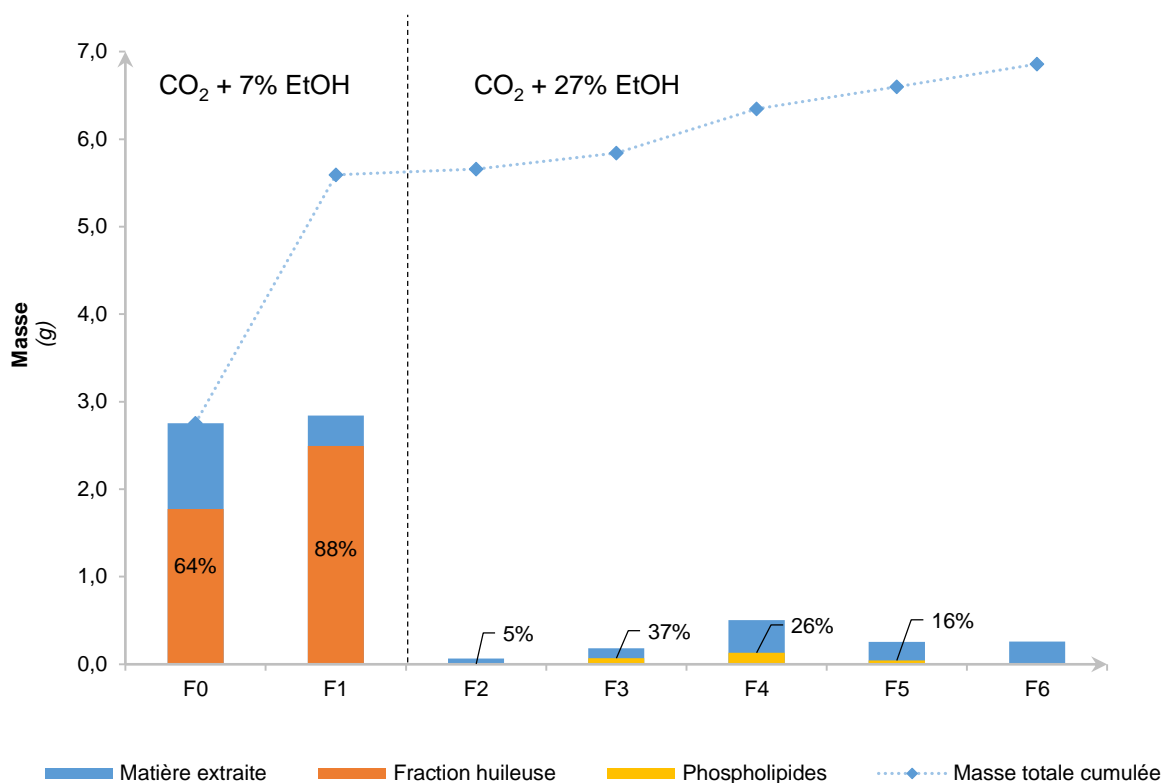


Figure 3.19 : Répartition des masses extraites dans les différentes fractions au cours d'une extraction par gradient à partir de cameline Bioplanète ($P = 25 \text{ MPa}$, $T = 45^\circ\text{C}$, EFS Cameline 11, $m_{\text{chargée}} = 60,0 \text{ g}$, débit $\text{CO}_2 = 12,3 \text{ g}\cdot\text{min}^{-1}$, réacteur de 490 mL).

En termes de rendement, les extractions réalisées avec les deux volumes de réacteur donnent les mêmes résultats (Tableau 3.29). Ainsi, malgré un temps de perçage différent et un temps de collecte non transposé, les deux extractions se sont comportées de la même façon et la transposition semble donc être une réussite pour le cas de la cameline.

Tableau 3.29 : Rendements obtenus pour les extractions par fluide supercritique avec gradient d'éthanol dans les deux systèmes d'extraction ($P = 25 \text{ MPa}$, $T = 45^\circ\text{C}$). Réacteur de 100 mL : EFS Cameline 10, $m_{\text{chargée}} = 55 \text{ g}$, débit $\text{CO}_2 = 6,5 \text{ g}\cdot\text{min}^{-1}$. Réacteur de 490 mL : EFS Cameline 11, $m_{\text{chargée}} = 60 \text{ g}$, débit $\text{CO}_2 = 12,3 \text{ g}\cdot\text{min}^{-1}$.

| | EFS Cameline 10 | EFS Cameline 11 |
|----------------------------|-----------------|-----------------|
| Réacteur (mL) | 100 | 490 |
| η_{global} (%) | 11 | 11 |
| η_{LT} (%) | 92 | 89 |
| η_{PL} (%) | 68 | 66 |

η_{global} : rendement d'extraction de matière totale extraite ; η_{LT} : rendement d'extraction de lipides totaux ; η_{PL} : rendement d'extraction de phospholipides.

II.3.2.2 Cas des sous-produits de la coquille Saint Jacques

La figure 3.20 présente les courbes de cinétique d'extraction de la matière totale extraite, des LT et des PL obtenues à partir de 30 g de coquille Saint Jacques introduite dans le réacteur de 490 mL. Tout comme dans le cas de la cameline, la cinétique d'extraction de la matière totale a un profil classique avec la reprise de l'extraction qui suit l'augmentation du pourcentage massique d'éthanol dans le fluide. Concernant les lipides totaux, une quantité de l'ordre de 2,5 g est collectée en F0, ce qui représente environ 74% de la masse totale de lipides extraits au cours de l'expérience. Le changement du pourcentage d'éthanol entraîne là encore une reprise de l'extraction, reprise plus modérée comparée à celle de la matière totale extraite. En effet environ 700 mg de LT sont extraits dans la fraction F2. Parmi ces 700 mg environ 400 mg sont des PL. Quelques milligrammes de PL sont extraits durant la première étape en CO₂ + 7% EtOH, mais cela reste minoritaire par rapport aux 400 mg extraits par CO₂ + 27% EtOH. En termes maintenant de composition des fractions (Figure 3.21), l'utilisation du gradient permet bien de séparer les phospholipides (éventuellement en F2) des autres lipides, présents essentiellement en F0. En tenant compte de la matière non lipidique dans les extraits, F0 est même une fraction composée à 90% de LT que l'on peut considérer comme non phosphorés au vu de sa faible quantité en PL (<1% de la masse de la fraction). La fraction la plus pure, F2, contient 1,7 g d'extrait réparti pour 24% en PL, 16% en lipides non phosphorés et 60% en matière non lipidique. Les rendements d'extraction sur les deux réacteurs sont présentés dans le tableau 3.30. Les rendements d'extraction sont similaires quelles que soient les espèces considérées.

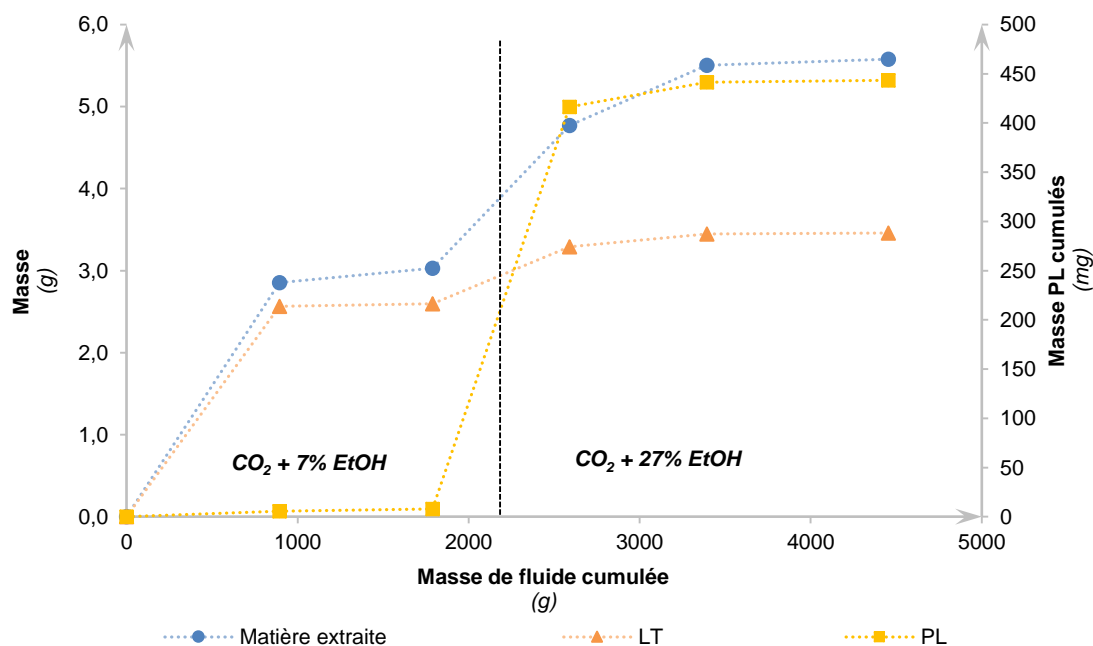


Figure 3.20 : Cinétique d'extraction de la matière totale, des lipides totaux (LT) et des phospholipides (PL) à partir des sous-produits de la coquille Saint Jacques (EFS St Jacques 7, $P = 25 \text{ MPa}$, $T = 45^\circ\text{C}$, débit CO₂ = $14,1 \text{ g.min}^{-1}$).

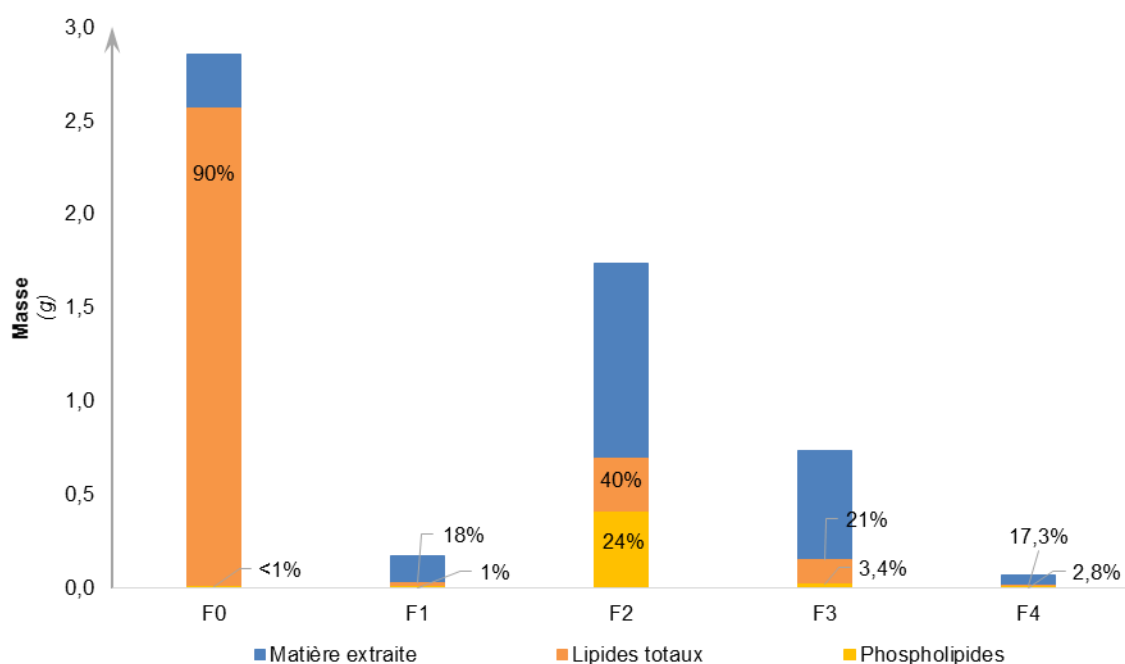


Figure 3.21 : Répartition des lipides totaux et des phospholipides lors d'une extraction par gradient à partir des sous-produits de la coquille Saint Jacques dans le réacteur de 490 mL (EFS Saint Jacques 7, $m_{\text{chargée}} = 30,0 \text{ g}$; débit $\text{CO}_2 = 14,1 \text{ g.min}^{-1}$).

Tableau 3.30 : Rendements obtenus pour les extractions par fluide supercritique avec gradient d'éthanol dans les deux réacteurs ($P = 25 \text{ MPa}$, $T = 45^\circ\text{C}$). Réacteur de 100 mL : EFS St Jacques 13, $m_{\text{chargée}} = 32,8 \text{ g}$, débit $\text{CO}_2 = 7,4 \text{ g.min}^{-1}$. Réacteur de 490 mL : EFS St Jacques 7, $m_{\text{chargée}} = 30 \text{ g}$, débit $\text{CO}_2 = 14,1 \text{ g.min}^{-1}$.

| | EFS St Jacques 13 | EFS St Jacques 7 |
|-----------------------------|-------------------|------------------|
| Réacteur (mL) | 100 | 490 |
| $\eta_{\text{global}} (\%)$ | 18 | 19 |
| $\eta_{\text{LT}} (\%)$ | 84 | 88 |
| $\eta_{\text{PL}} (\%)$ | 69 | 75 |

η_{global} : rendement d'extraction de matière totale extraite ; η_{LT} : rendement d'extraction de lipides totaux ; η_{PL} : rendement d'extraction de phospholipides.

II.4.2 Influence de la masse introduite

Dans l'étude du fonctionnement du réacteur à 100 mL, l'autoclave est rempli au maximum de sa capacité (35 g dans le cas de la coquille Saint Jacques et 60 g dans le cas du tourteau de cameline). Le changement de réacteur permet de faire varier le paramètre masse dans le réacteur en doublant la charge dans les deux cas : 120 g de cameline et 60 g de coquille Saint Jacques, tout en gardant un régime d'écoulement laminaire. Les temps de collecte sont ajustés suivant le temps de perçage de l'éthanol. Le volume non occupé par la charge est rempli par des billes de verre de diamètre 2 mm.

Un effet négatif possible d'une augmentation de la charge est la saturation du fluide extractant. Des extractions réalisées par ailleurs dans l'équipe sur une graine riche en huile (résultat confidentiel) ont montré que le fluide peut solvater jusqu'à 10 mg d'huile.g⁻¹ de fluide, résultat qui concorde avec les données de solubilité de différentes huiles (Follegatti-Romero et al., 2009). A partir de cette valeur, on peut alors calculer la quantité de fluide nécessaire pour extraire la totalité des lipides à partir d'une masse chargée donnée (Tableau 3.31).

Tableau 3.31 : Estimation de la masse de fluide nécessaire à l'extraction des lipides en fonction de la charge, basée sur une solubilité d'huile d'environ 10 mg.g⁻¹ de fluide.

| Matrice | Cameline <i>Bioplanète</i> | Cameline <i>Iterg</i> | Coquille St Jacques |
|---|-------------------------------|--------------------------|---------------------|
| m_{chargée} (g) | 120 | 120 | 60 |
| m_{LT} dans la charge (g) | 13,4 | 12,1 | 7,7 |
| m_{solvant} (g) | 1 340 | 1 210 | 770 |

m : masse ; LT : lipides totaux ; mat. : matière.

Les courbes d'extraction de la matière totale, des LT et des PL sont présentées en figure 3.22. D'après la représentation en masse non normalisée, plus la masse initiale introduite est importante, plus les quantités extraites sont grandes quelle que soit la famille considérée (masse totale extraite, lipides non phosphorés/lipides totaux et phospholipides) et la matrice utilisée. Il semble ainsi avantageux d'augmenter la charge initiale dans la mesure où, pour un temps donné, la quantité de PL en sortie est plus grande, ce qui est un des objectifs majeurs de l'extraction dans ce projet.

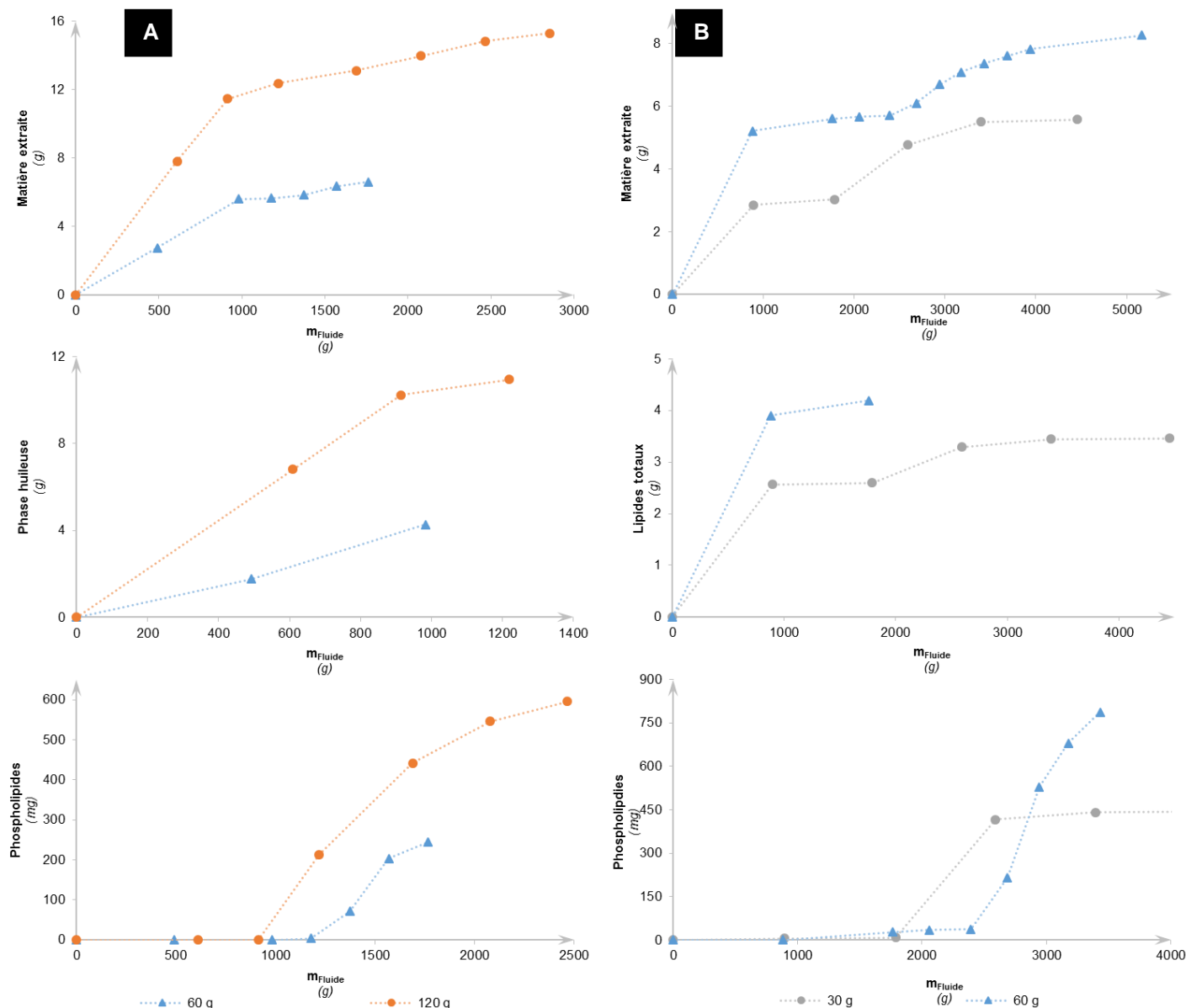


Figure 3.22 : Influence de la masse introduite sur l'extraction de la matière totale, des lipides totaux et des phospholipides avec le réacteur de 490 mL ($P = 25 \text{ MPa}$, $T = 45^\circ\text{C}$, débit $\text{CO}_2 = 11,8 \text{ g.min}^{-1}$ (120g) et $12,3 \text{ g.min}^{-1}$ (pour 60g)) A : tourteau de cameline Bioplanète (EFS cameline 11 et EFS cameline 13) ; B : sous-produit de la coquille Saint Jacques (EFS St Jacques 7 débit $\text{CO}_2 = 14 \text{ g.min}^{-1}$ et EFS St Jacques 5 débit $\text{CO}_2 = 13,6 \text{ g.min}^{-1}$).

Pour mesurer plus précisément si l'on a un facteur 2 sur la matière extraite, les courbes sont représentées en masse d'extrait rapportée à la masse de charge (Figure 3.23). Pour la cameline, le facteur 2 est parfaitement respecté pour la masse totale extraite, alors que l'on obtient un facteur d'environ 2,5 – 3 pour les lipides totaux. Pour les phospholipides, le facteur 2 est globalement respecté. L'augmentation de la charge de tourteau de cameline permet d'avoir une transposition quasi-linéaire sur les masses de PL extraits et d'extraire environ 600 mg de PL (contre 244 mg pour une masse chargée de 60 g).

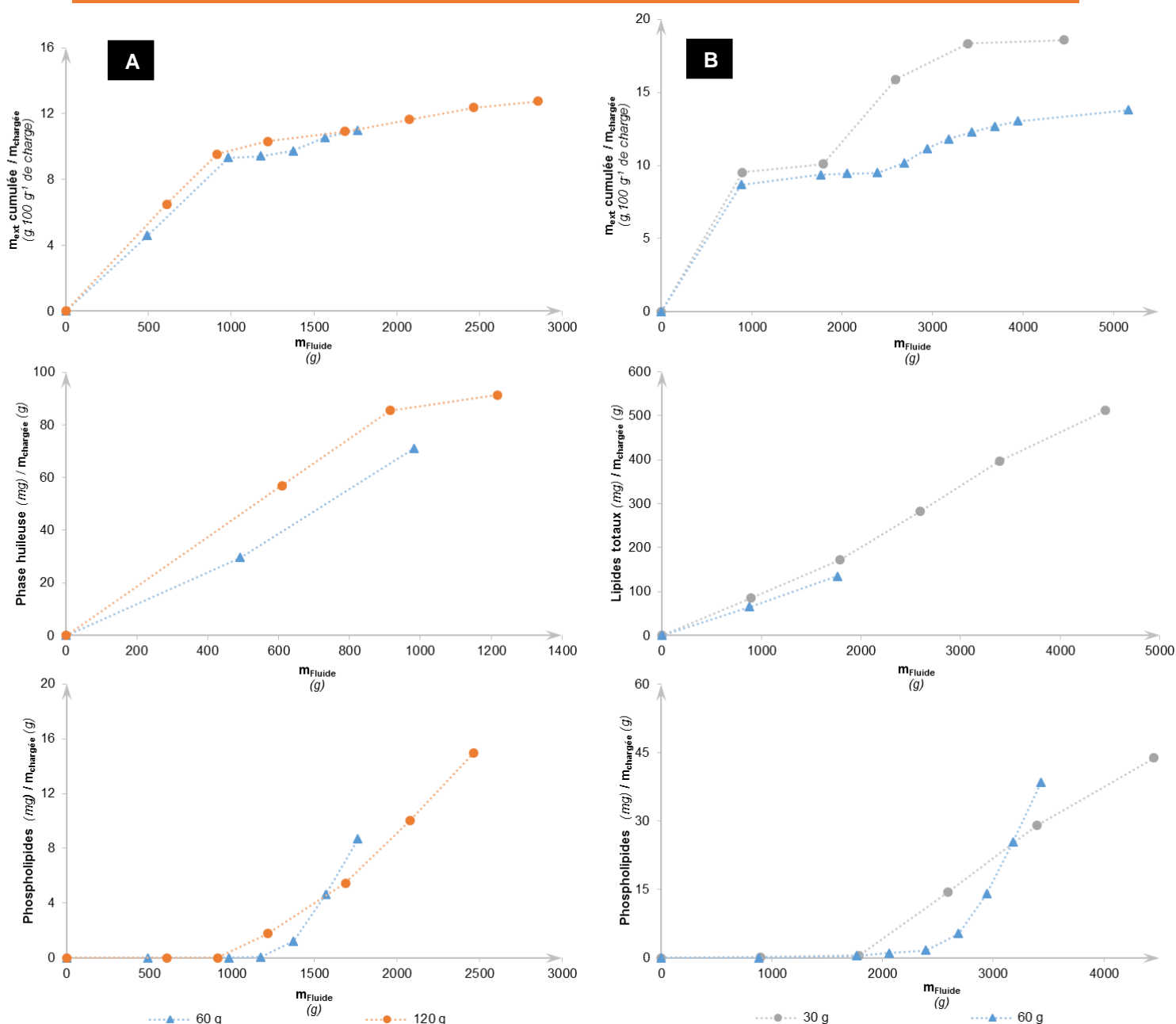


Figure 3.23 : Influence de la masse introduite sur l'extraction de la matière totale, des lipides totaux et des phospholipides avec le réacteur de 490 mL ($P = 25$ MPa, $T = 45^{\circ}\text{C}$) A : tourteau de cameline Bioplanète (débit $\text{CO}_2 = 11,8 \text{ g}\cdot\text{min}^{-1}$ (120g) et $12,3 \text{ g}\cdot\text{min}^{-1}$ (pour 60g)); B : sous-produit de la coquille Saint Jacques (débit $\text{CO}_2 = 13,6 \text{ g}\cdot\text{min}^{-1}$ (60g) et $14,1 \text{ g}\cdot\text{min}^{-1}$ (pour 30g)).

Pour la coquille Saint Jacques, une influence de la masse chargée existe sur la matière extraite (Figure 3.23.B). Quand on passe de 30 à 60 g de charge, les masses extraites rapportées à la masse chargée sont équivalentes quand on extrait par $\text{CO}_2 + 7\%$ d'éthanol. Par contre, on a proportionnellement moins de matière extraite sur une charge de 60 g que sur une charge de 30 g. Ainsi la quantité de matière extraite totale est d'autant plus importante que la masse traitée (initiale) est faible. Pour les lipides totaux non dosés, on ne peut pas conclure. Pour les PL, on n'a pas du tout la même cinétique avec des PL qui apparaissent plus tardivement ($m_{\text{chargée}} = 60 \text{ g}$). Ce comportement a déjà été observé (Thong Deng, 2011).

Si l'on raisonne maintenant en termes de rendements d'extraction (Tableau 3.32), il apparaît que les rendements sont du même ordre de grandeur, pour les deux masses de charge, autrement dit, il n'y a pas de différence notable sur l'efficacité de l'extraction quand on la poursuit suffisamment longtemps.

Tableau 3.32 : Rendements obtenus pour les extractions par fluide supercritique avec gradient d'éthanol dans le réacteur de 490 mL ($P = 25 \text{ MPa}$, $T = 45^\circ\text{C}$, débit $\text{CO}_2 = 13,0 \pm 1,1 \text{ g.min}^{-1}$).

| Matrice | Cameline Bioplanète | | Coquille Saint Jacques | |
|----------------------------|---------------------|-----|------------------------|----|
| $m_{\text{chargée}}$ (g) | 60 | 120 | 30 | 60 |
| η_{global} (%) | 11 | 13 | 19 | 14 |
| η_{LT} (%) | 89 | 93 | 88 | 87 |
| η_{PL} (%) | 66 | 70 | 75 | 74 |

$m_{\text{chargée}}$: masse chargée ; η_{global} : rendement d'extraction de matière totale extraite ; η_{LT} : rendement d'extraction de lipides totaux ; η_{PL} : rendement d'extraction de phospholipides.

II.4.3 Extraction sur d'autres tourteaux que le tourteau de cameline

Sur la base des résultats obtenus à partir du tourteau de cameline, nous avons voulu tester l'application du procédé à deux autres tourteaux d'oléagineux que sont le lin et le sésame.

II.4.3.1 Composition fixe en éthanol

La figure 3.24 compare des extractions réalisées à une composition fixe en éthanol de 30%. Les courbes de cinétique d'extraction montrent un comportement similaire entre les deux matrices et avec le tourteau de cameline (Figure 3.12, § II.2.2-Chapitre 3) : une extraction de matière importante en début d'extraction, suivie d'un ralentissement jusqu'à l'obtention d'un plateau. La différence dans la quantité extraite du sésame peut s'expliquer notamment par une quantité de LT initialement plus importante dans ce tourteau. En effet, le tourteau de lin contient environ 12% de LT, tandis que celui du sésame en contient 26% (Tableau 3.8).

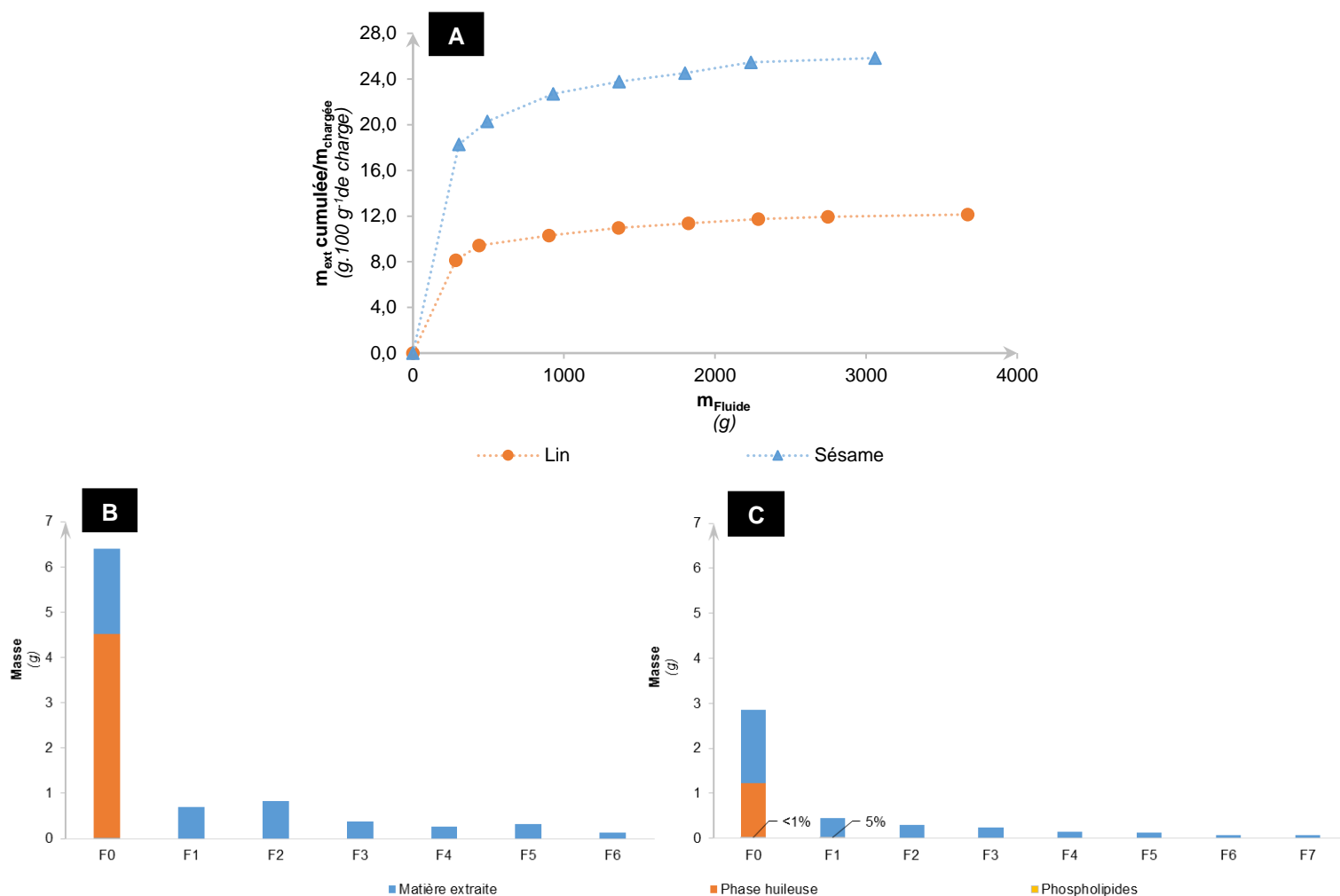


Figure 3.24 : Cinétiques d'extraction obtenues à partir de deux matrices oléagineuses différentes (A) et répartition de la matière lipidique non lipidique dans les fractions. B : Tourteau de sésame (EFS Sésame T3, débit $\text{CO}_2 = 14,5 \text{ g.min}^{-1}$, taux fixe d'éthanol : 27%mass) ; C : Tourteau de lin (EFS Lin 3, débit $\text{CO}_2 = 15,5 \text{ g.min}^{-1}$, taux fixe d'éthanol : 27%mass).

Tout comme dans le réacteur de 100 mL pour la cameline, la pureté en phospholipides dans les fractions F0 et F1 est faible, moins de 5% de la masse totale de la fraction. Cependant d'après les rendements d'extraction en phospholipides (Tableau 3.33), plus de 70% des phospholipides sont extraits. Le rendement global obtenu pour l'extraction à partir du tourteau de sésame est deux fois supérieur à celui obtenu pour l'extraction à partir du tourteau de lin. Cela s'explique notamment par la quantité de LT dans le tourteau de sésame qui est le double de celle du tourteau de lin. Les rendements d'extraction des lipides totaux sont compris entre 90 et 95%. Ainsi pour une composition à 30% d'éthanol dans le fluide, les résultats sont comparables entre les trois extractions. La pureté en phospholipides dans les fractions étudiées est faible pour F0 (moins de 1% de la masse de la fraction), tandis que pour F1 elle est de 5%mass de la fraction (cas du lin).

Tableau 3.33 : Rendements d'extraction globale, en lipides totaux et en phospholipides à partir de deux tourteaux d'oléagineux en utilisant le réacteur de 490 mL. ($P = 25 \text{ MPa}$, $T = 45^\circ\text{C}$, débit $\text{CO}_2 = 13,0 \pm 1,1 \text{ g.min}^{-1}$, masse chargée 35 g).

| | Lin | Sésame |
|-----------------------------|-----|--------|
| $\eta_{\text{global}} (\%)$ | 12 | 26 |
| $\eta_{\text{LT}} (\%)$ | 95 | 91 |
| $\eta_{\text{PL}} (\%)$ | 87 | 71 |

η_{global} : rendement d'extraction de matière totale extraite ; η_{LT} : rendement d'extraction de lipides totaux ; η_{PL} : rendement d'extraction de phospholipides.

II.4.3.2 Influence du gradient d'éthanol

L'effet du gradient d'éthanol sur l'extraction et la pureté en phospholipides est aussi étudié sur les tourteaux de lin et de sésame. Dans ces essais, le dosage des PL est réalisé dans les fractions correspondant au changement du taux d'éthanol et à la fraction suivante (F2 et F3). Pour les deux extractions, la fraction F0 se compose d'une phase éthanolique et d'une phase huileuse visible à l'œil nu de couleur jaune. La fraction F0 (1 h d'extraction à 7% EtOH, environ 1 kg de fluide) correspond à plus de 65% de la masse totale extraite sur la durée totale de l'extraction. Les 30% d'extrait total restant se répartissent dans les fractions suivantes (essentiellement en F1, F2 et F3), avec des quantités qui restent bien inférieures au gramme. La fraction F2, qui correspond au changement de pourcentage d'éthanol dans le fluide, contient une quantité de matière supérieure à celle de la fraction F1 avec, cependant, un temps de collecte inférieur (20 min versus 60 min). Une reprise de l'extraction peut être considérée, surtout si l'on tient compte de la quantité extraite par rapport à la masse de fluide utilisée.

L'analyse par RMN ^{31}P des fractions F2 et F3 de EFS Lin 4 et EFS Sésame T1 donne une quantité en phospholipides comprise entre 7 et 31 mg pour le lin et entre 75 et 86 mg pour le sésame. Ces faibles quantités résultent d'une masse chargée plus faible (35 g) que dans le cas de la cameline (60 g) pour le réacteur de 490 mL. La pureté en phospholipides des fractions F2 et F3 obtenues au cours de ces deux extractions est comprise entre 6 et 17% de la masse de la fraction (Figure 3.25).

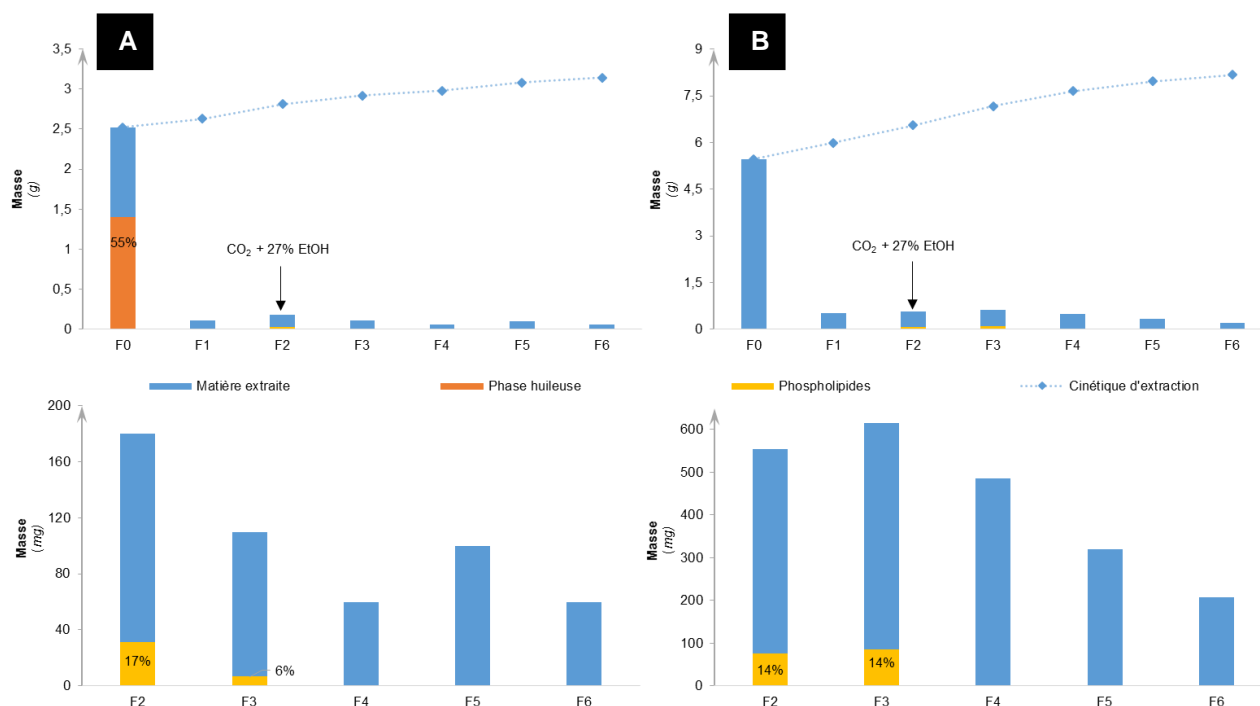


Figure 3.25 : Cinétique d'extraction et répartition des lipides lors de l'extraction par fluide supercritique avec gradient d'éthanol. A : Extraction réalisée à partir du tourteau de lin (EFS lin 4, réacteur de 490 mL, débit $\text{CO}_2 = 15,5 \text{ g.min}^{-1}$, $m_{\text{chargée}} = 35 \text{ g}$) ; B : Extraction réalisée à partir du tourteau de sésame (EFS Sésame T1, réacteur de 490 mL, débit $\text{CO}_2 = 14,7 \text{ g.min}^{-1}$, $m_{\text{chargée}} = 35 \text{ g}$).

Les rendements d'extraction des LT obtenus lors de l'extraction à partir des tourteaux de lin et de sésame sont compris entre 87 et 95%, valeur du même ordre de grandeur que celles obtenus pour les extractions à partir du tourteau de cameline dans le réacteur de 490 mL avec le protocole de gradient d'éthanol (Tableau 3.34). Le rendement d'extraction en PL obtenu pour l'extraction à partir du tourteau de lin est de 79%, rendement similaire à ceux obtenus précédemment pour le tourteau de cameline. Pour le tourteau de sésame, le rendement d'extraction des PL est plus faible, mais cela peu s'expliquer par la faible quantité de PL présente dans le tourteau de sésame.

Tableau 3.34 : Rendements d'extraction global, en lipides totaux et en phospholipides à partir de deux tourteaux d'oléagineux en utilisant le réacteur de 490 mL (Temps d'extraction : 4h20, débit de $\text{CO}_2 = 15,5 \text{ g.min}^{-1}$ pour le lin et de $14,7 \text{ g.min}^{-1}$ pour le sésame, masse chargée 35 g).

| | Lin | Sésame |
|-----------------------------|-----|--------|
| $\eta_{\text{global}} (\%)$ | 9 | 23 |
| $\eta_{\text{LT}} (\%)$ | 95 | 87 |
| $\eta_{\text{PL}} (\%)$ | 79 | 65 |

η_{global} : rendement d'extraction de matière totale extraite ; η_{LT} : rendement d'extraction de lipides totaux ; η_{PL} : rendement d'extraction de phospholipides.

Par rapport aux protocoles à 30% d'éthanol, le gradient est moins efficace, laissant supposer qu'il faut conduire l'extraction encore plus longtemps pour continuer à extraire les PL. Pour le sésame, seuls 65% des PL sont extraits en 4h10 avec le gradient contre 71% en 3h30 à 30% EtOH.

II.5 ANALYSES DES LIPIDES EXTRAITS

Jusqu'à présent, nous avons discuté de l'extraction en termes de bilan et de familles extraites (phase huileuse et PL). Nous nous intéressons ici à l'analyse des classes de lipides extraits, dont notamment la nature des PL extraits, collectés principalement dans les fractions F2 et F3 et à l'identification des acides gras de la fraction huileuse collectée en F0.

II.5.1 Analyse des classes de lipides présentes dans les fractions

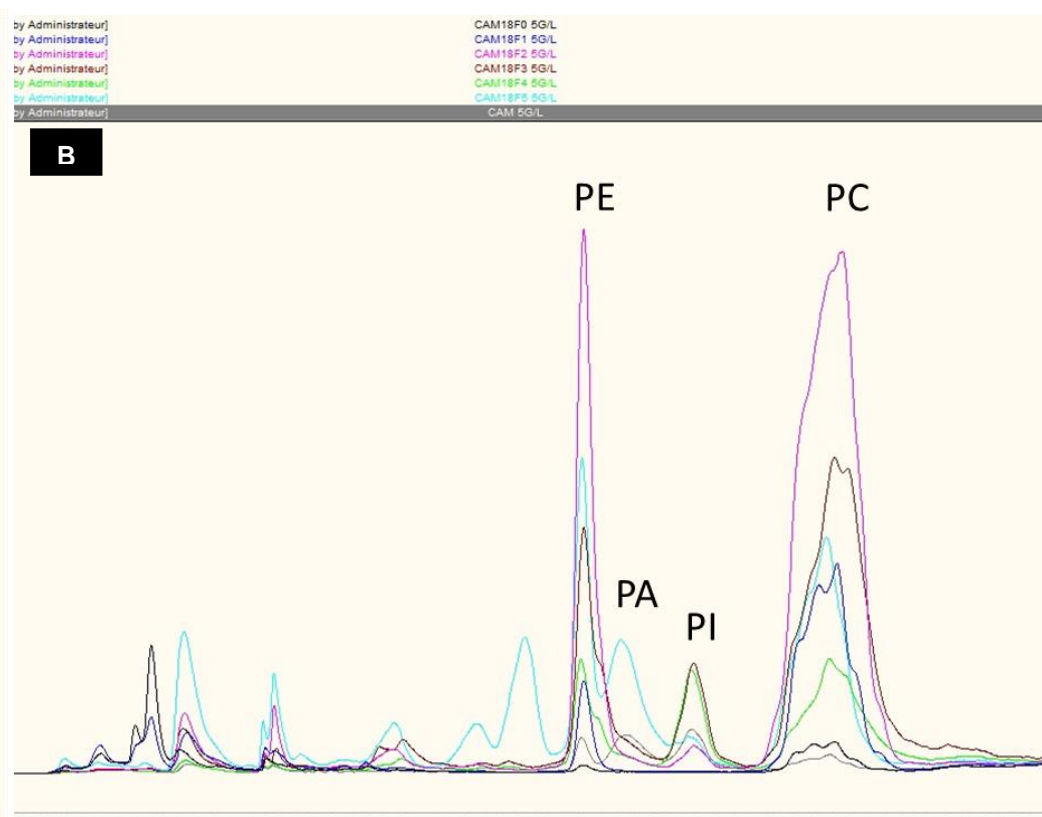
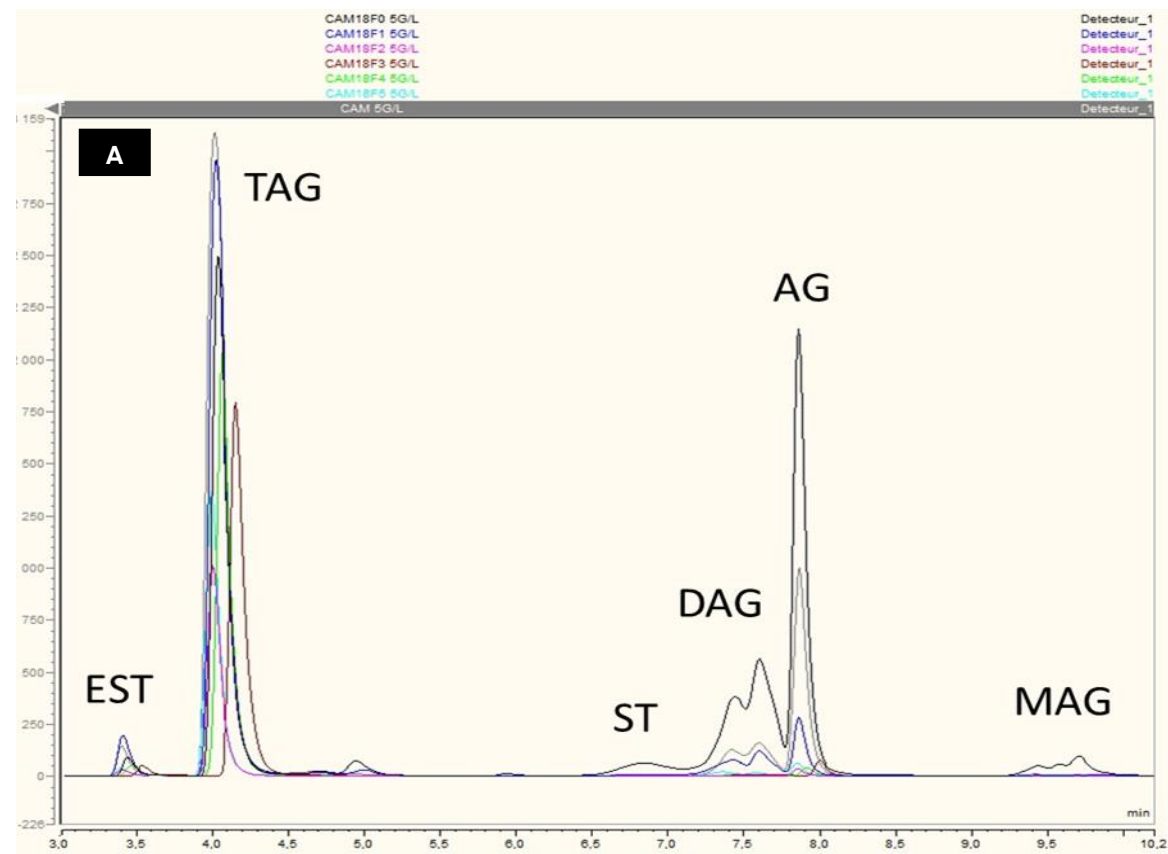
Une analyse qualitative des classes de lipides est réalisée sur différentes fractions obtenues par extraction par fluide supercritique. La totalité des fractions de deux extractions (EFS cameline 18 et EFS St Jacques 13) est analysée.

II.5.1.1 Analyse qualitative des fractions EFS Cameline 18

L'analyse des classes de lipides dans le cas de la cameline s'est faite sur les fractions éthanoliques (de F0 à F5) et aussi sur les phases huileuses présentes en F0 et F1. Les chromatogrammes obtenus par LC-DEDL des fractions EFS Cameline 18 sont présentés dans la figure 3.26. Tout d'abord, les triacylglycérols sont présents dans l'ensemble des fractions. Dans le cas des fractions F0 et F1, les triacylglycérols sont trouvés dans les deux phases (huile et éthanol). Les di- et monoglycérides sont extraits dans les deux premières fractions. Cependant, contrairement aux triglycérides, ils sont principalement trouvés dans la phase éthanolique. Les AGL et les esters de stérols sont extraits tout au long de l'extraction. Néanmoins, les AGL sont identifiés uniquement dans les phases éthanoliques des fractions, tandis que les EST sont identifiés dans les deux phases (huile + éthanol), quand elles sont présentes. Enfin, les stérols libres sont identifiés uniquement dans la fraction éthanolique de la fraction F0.

Pour les PL, ils sont surtout identifiés à partir de la fraction F2, fraction correspondant à la première collecte avec 30% d'éthanol. Les principaux PL extraits dans cette fraction sont la PC et la PE. Un pic caractéristique du PI est identifié, mais d'intensité moindre que les deux autres. Dans les fractions suivantes, l'intensité des pics caractéristiques de la PC et de la PE sont plus faibles que dans la fraction F2, tandis que celui de PI est plus important. De plus, une quantité non négligeable de PA semble être extraite dans la fraction F5. D'après ces résultats, une sélectivité d'extraction vis-à-vis des classes de PL existe, résultat confirmé par l'analyse RMN ^{31}P . Enfin, des traces de PL sont trouvées dans le surnageant éthanolique de F0 et F1, fractions collectées avec 7% d'éthanol dans le fluide extractant, tandis qu'aucun signal n'est détecté pour la phase huileuse de ces fractions.

RÉSULTATS ET DISCUSSION



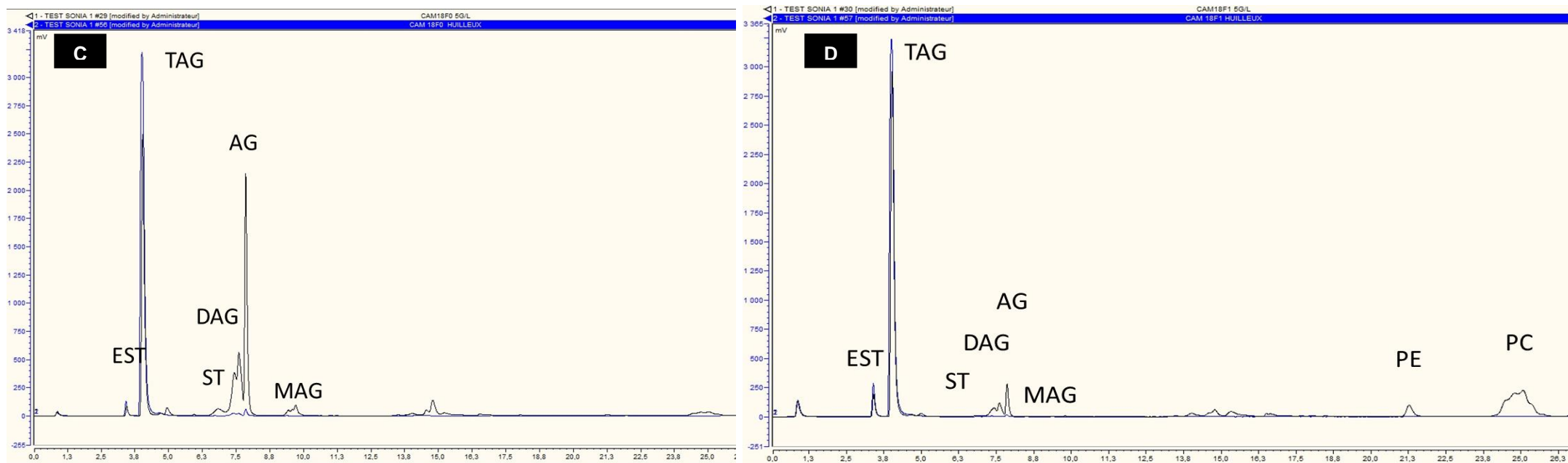


Figure 3.26 : Classes de lipides présentes dans les fractions de EFS Cameline 18 par analyse LC-DEDL. A : Fractions éthanoliques zoom sur les lipides apolaires ; B : Fraction éthanoliques zoom sur les lipides polaires, C : Comparaison de la phase éthanolique et de la phase huileuse de EFS Cameline 18 F0 ; D : Comparaison de la phase éthanolique et de la phase huileuse de EFS Cameline 18 F1.

TAG : triacylglycérol ; DAG : diacylglycérol ; MAG : monoacylglycérol ; EST : ester de stérol ; ST : stérol ; AG : acide gras libre ; PE : phosphatidyléthanolamine ; PC : phosphatidylcholine ; PI : phosphatidylinositol ; PA : acide phosphatidique.

II.5.1.2 Analyse qualitative des fractions EFS Saint Jacques 13

L'analyse des fractions EFS Saint Jacques 13 présentée en figure 3.27 montre la présence des lipides neutres (TAG, DAG, MAG et esters de stérol) dans les fractions F0 et F1, fractions obtenues avec 7% d'éthanol dans le fluide extractant. Les AGL sont détectés dans toutes les fractions. De plus, dans la fraction F0 aucun PL n'est détecté, tandis que dans la fraction F1, quelques traces de PL sont présentes (PE et PC). La fraction F2 contient des PL PE, PC, PI avec une intensité supérieure à celle des autres fractions. Cependant le profil chromatographique de cette partie reste difficile à interpréter.

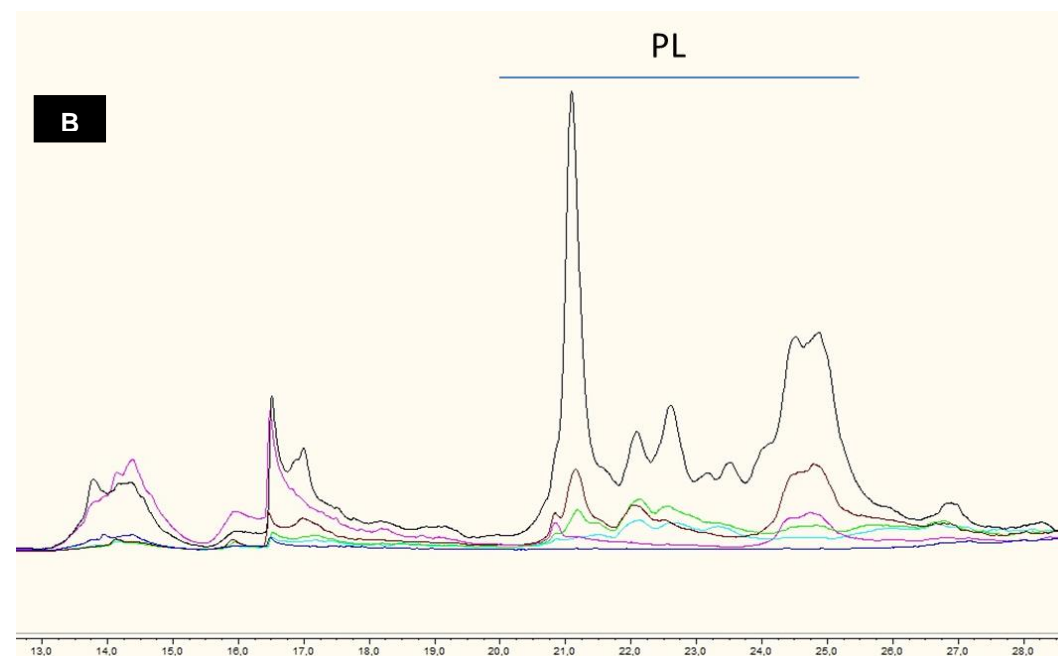
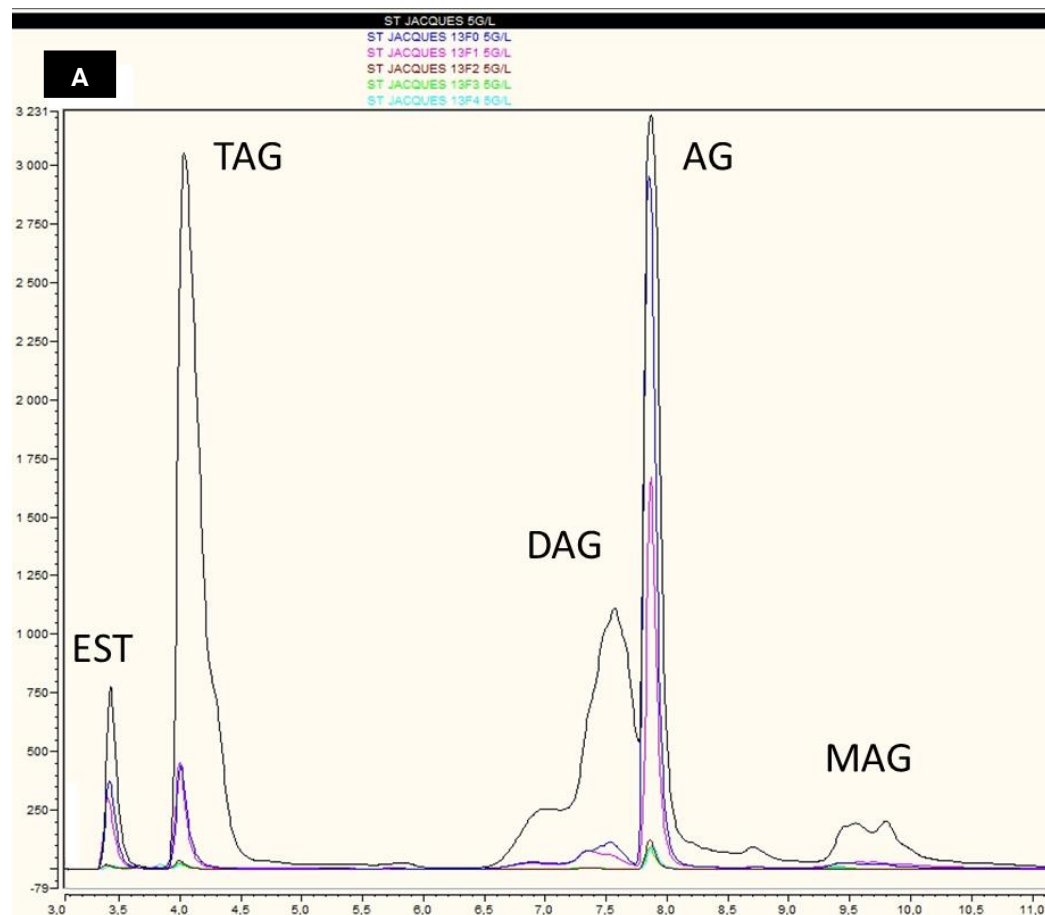


Figure 3.27 : Classes de lipides présentes dans les fractions EFS St Jacques 13 ; A : Zoom sur la partie apolaire ; B : Zoom sur la partie polaire.
 TAG : triacylglycérol ; DAG : diacylglycérol ; MAG : monoacylglycérol ; EST : ester de stérol ; ST : stérol ; AGL : acide gras libre ; PL : phospholipides.

II.5.2 Classes de phospholipides dans les fractions

L'analyse des classes de PL dans les fractions est complexe. En effet, comme le montre la figure 3.28, des variabilités existent dans le déplacement chimique de certains pics. Par exemple, lors de la superposition des spectres RMN ^{31}P des lipides totaux du tourteau de cameline Bioplanète avec des fractions issues du même tourteau, le nombre de pic peut être différent. Ainsi, dans le cas d'EFS cameline 10 F2, un pic supplémentaire est observé par rapport à celui des lipides totaux du tourteau.

Le tableau 3.35 présente les phospholipides identifiés dans des fractions supercritiques. Dans la fraction F2, les PL majoritaires sont la PC et le PE qui représentent plus de 60% des PL. De plus, la proportion de PC dans les fractions est généralement supérieure à celle trouvée dans la matrice initiale au détriment du PI et du PA. En effet, la phosphatidylcholine est une molécule zwitterionique (pour des pH supérieurs à 4) donc de polarité plus faible que le phosphoinositol et l'acide phosphatidique, qui eux sont deux phospholipides présentant une charge nette négative. Malgré la présence de 30% d'éthanol dans le fluide extractant, cela ne semble pas suffisant pour extraire de façon non sélective les phospholipides.

Tableau 3.35 : Identification et quantification des classes de phospholipides analysés dans les fractions supercritiques (en gras, rappel des compositions en phospholipides des matrices initiales).

| Nom de la fraction | Classe de phospholipides rapportée aux PL totaux (%mol) | | | | |
|----------------------------|---|-----------|-----------|-----------|----------|
| | PC | PI | PE | PA | PG |
| Cameline Iterg | 50 | 23 | 18 | 6 | 3 |
| EFS Cameline 18 F2 | 65 | 6 | 23 | 3 | 3 |
| EFS Cameline 18 F3 | 41 | 21 | 20 | 10 | 8 |
| EFS Cameline 14 F3 | 71 | 3 | 23 | | 2 |
| Cameline Bioplanète | 17 | 24 | 12 | 42 | 5 |
| EFS Cameline 10 F2 | 42 | 1 | 23 | 31 | 3 |

PL : phospholipide ; PC : phosphatidylcholine ; PI : phosphatidylinositol ; PE : phosphatidyléthanolamine ; PA : acide phosphatidique ; PG : phosphatidylglycérol ; EFS : extraction par fluide supercritique.

Dans le cas de la coquille Saint Jacques, les attributions sont plus compliquées (Figure 3.28). Cependant, on distingue toujours la présence de pics de phosphonolipides dans les fractions.

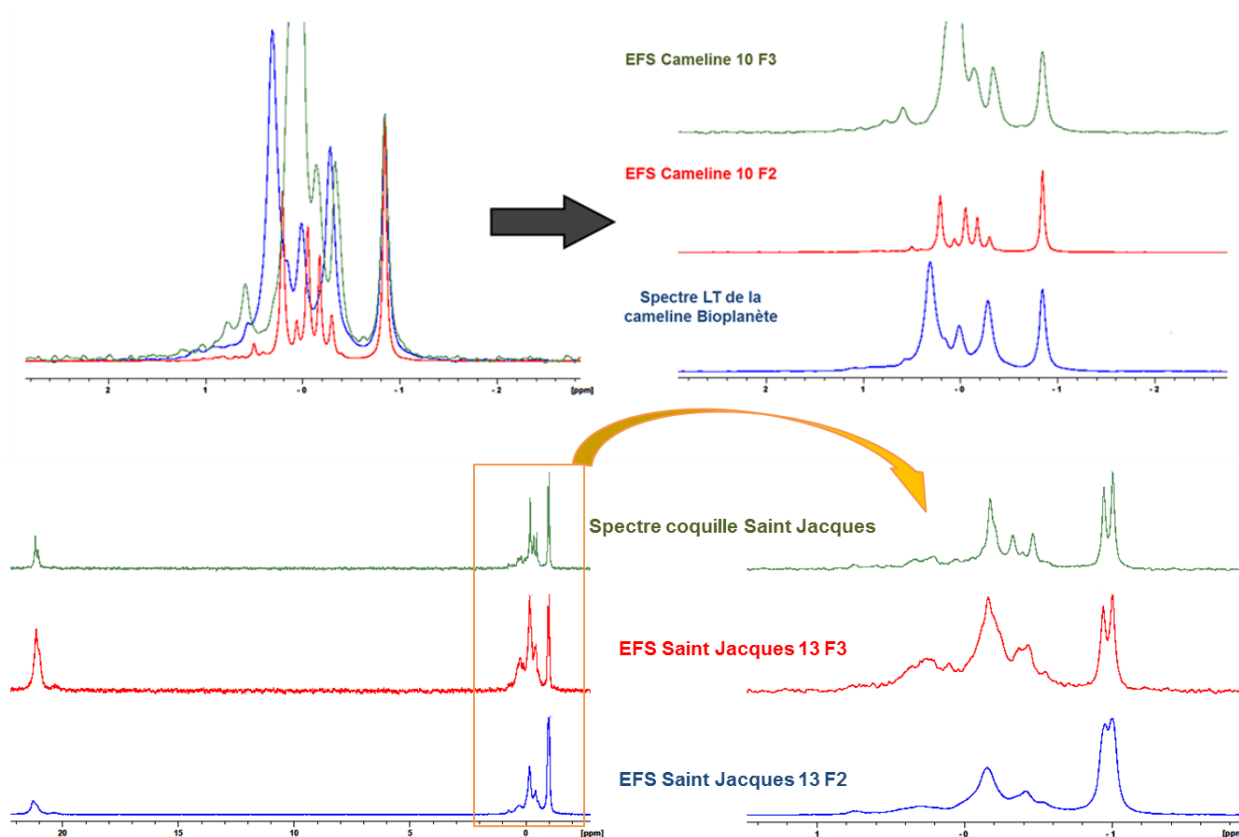


Figure 3.28 : Spectre RMN ^{31}P de fractions supercritiques.

II.5.3 Composition en acides gras des fractions huileuses de F0

La phase huileuse présente dans les fractions F0 issues des tourteaux d'oléagineux sont caractérisées en termes de profil en acides gras (Tableau 3.36 et Annexe 6, article publié dans le journal Oilseeds and fats, Crops and Lipids).

Pour la cameline, la composition en acides gras de la fraction huileuse est étudiée sur deux fractions F0 extraites avec des taux d'éthanol différents (15% et 30% d'éthanol dans le fluide). Aucune différence dans leur composition en AG de plus de 10% d'écart n'est observée. La comparaison avec la composition en AG du tourteau de cameline (Bioplanète) montre une différence au niveau du 16:0 (écart compris entre 19 et 24%) et du 20:1 (n-9) (écart compris entre -24 et -20%).

Pour le lin, la composition en acides gras des deux fractions huileuses obtenues avec 7% d'éthanol et un même temps de collecte est similaire. La comparaison avec les acides gras présents dans le tourteau de lin ne montre pas de différence exceptée pour le 16:0, où l'écart est de 12%.

Pour le sésame, la composition en acides gras des deux fractions huileuses obtenues avec des pourcentages d'éthanol différents est similaire exceptée pour le 16:0 où un écart de 14% est trouvé. La composition entre 7% d'éthanol et la composition du tourteau de sésame est similaire, cependant

une différence existe pour le 16:0 et le 18:1 n-9 extrait par CO₂ + 30% d'éthanol et l'extraction par la méthode Folch.

Ainsi, quel que soit le pourcentage d'éthanol (7%, 15% et 30% d'éthanol) appliqué sur les tourteaux d'oléagineux, la composition en AG de la phase huileuse de la fraction F0 est similaire. De légères différences existent entre la composition de ces fractions et la composition en acides gras des tourteaux, notamment au niveau du 16:0. Ceci suggère que les lipides estérifiés par ces acides gras sont extraits sans sélectivité particulière. Cette absence de sélectivité de l'EFS est aussi observée dans la littérature (Martínez et al., 2008 ; Mezzomo et al., 2010 ; Sánchez-Vicente et al., 2009).

Tableau 3.36 : Profil en acides gras des phases huileuses obtenues à partir de tourteaux d'oléagineux (EFS cameline 1, EFS cameline 2, EFS lin 1, EFS Lin2, EFS Sésame T1, EFS Sésame T2).

| Protocole Composition en AG (%mass) | Cameline Bioplanète | | | Lin | | | Sésame | | |
|---|---------------------|-------------------------------|-------------|----------|-------------------------------|----------|----------|-------------------------------|-------------|
| | Tourteau | Phase huileuse fraction F0 | | Tourteau | Phase huileuse fraction F0 | | Tourteau | Phase huileuse fraction F0 | |
| | | 15% EtOH | 30% EtOH | | Gradient | Gradient | | Gradient | 30% EtOH |
| 16:0 | 7,6 | 6,2 | 5,8 | 7,2 | 6,4 | 6,3 | 8,4 | 8,4 | 7,3 |
| 18:0 | 2,2 | 2,1 | 2,1 | 3,6 | 3,4 | 3,2 | 5,9 | 6,3 | 6,1 |
| 18:1(n-9) | 14,3 | 12,6 | 13,0 | 18,9 | 18,7 | 17,9 | 39,0 | 41,5 | 43,7 |
| 18:1(n-7) | 1,1 | 1,0 | 1,3 | 0,8 | 0,9 | 0,7 | 0,7 | 0,7 | 0,8 |
| 18:2(n-6) | 22,5 | 19,9 | 20,1 | 22,2 | 21,0 | 21,3 | 45,0 | 42,0 | 41,0 |
| 18:3(n-3) | 35,0 | 37,4 | 36,4 | 47,1 | 49,4 | 50,3 | 0,4 | 0,4 | 0,4 |
| 20:0 | 1,1 | 1,3 | 1,3 | 0,2 | 0,0 | 0,1 | 0,5 | 0,6 | 0,6 |
| 20:1(n-9) | 11,0 | 13,2 | 13,7 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,1 | 0,2 |
| 20:3(n-6) | 1,7 | 1,9 | 1,9 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,1 | 0,0 | 0,0 |
| 21:0 | 1,2 | 1,5 | 1,4 | 0,0 | 0,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |
| 22:1(n-9) | 2,3 | 2,8 | 2,9 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 |

AG : acide gras ; EtOH : éthanol.

II.6 CONCLUSION

Différents taux d'éthanol ont été testés afin d'établir un protocole adapté à l'extraction sélective des PL vis-à-vis des autres molécules lipidiques. Les résultats montrent que l'utilisation d'un mélange à 30% d'éthanol dans le fluide extractant permet d'extraire environ 90% des lipides totaux et plus de 70% des phospholipides présents dans les matrices testées (tourteau de cameline, de lin et de sésame et sous-produits de la coquille Saint Jacques). La diminution de la proportion d'éthanol dans le milieu extractant conduit à une diminution du rendement d'extraction des PL ainsi qu'à une diminution du rendement en LT, notamment pour la coquille Saint Jacques. Cependant, des PL sont encore extraits à hauteur de 20% de la quantité présente dans la charge avec une teneur de 7%

d'éthanol, pour le tourteau de cameline et la coquille Saint Jacques. De plus, la pureté en PL et la quantité extraite de PL sont difficilement compatibles dans les extractions avec 15 et 30% d'éthanol.

Ainsi, pour augmenter la pureté des phospholipides vis-à-vis des autres lipides dans le but de formuler des liposomes, un protocole en deux étapes a été développé :

- la première visant à extraire majoritairement les lipides autres que les phospholipides en utilisant 7% d'éthanol dans le fluide extractant ;
- la seconde visant à récupérer les phospholipides en utilisant 27% d'éthanol.

Ce protocole est validé sur deux systèmes d'extraction (réacteur de 100 mL et réacteur de 490 mL) et sur différentes matrices végétales et une matrice animale. L'analyse des fractions confirme la présence de lipides neutres ainsi que d'acides gras libres dans les fractions collectées avec 7% d'éthanol. Cependant, quelques traces de PL sont trouvées notamment dans la fraction F1. Lors du changement du taux d'éthanol, les PL sont extraits avec une pureté dans les fractions collectées comprise entre 20 et 50% de la masse de la fraction. Les principaux PL extraits dans les premières fractions suivant l'augmentation d'éthanol sont la PC et PE représentant plus de 60% des PL extraits.

La transposition dans un réacteur de plus grand volume permet de charger davantage de matière et ainsi d'extraire une quantité plus importante de phospholipides (environ 600 mg de PL extraits pour 120 g de tourteau de cameline contre 240 mg pour 60 g de tourteau). Enfin, les différents paramètres opératoires testés (disposition de la matière dans le réacteur, le diamètre des billes, l'humidité de la matière chargée, le pourcentage d'eau présent dans l'éthanol) n'influencent pas la pureté ou la quantité de PL extraits dans les fractions. Cependant lors de l'utilisation d'éthanol absolu pour les extractions, une diminution de 20 points du rendement d'extraction en PL est observée.

Une partie des résultats présentés dans cette partie sont publiés dans la revue *Oilseed & fat Crops and Lipids* (Annexe 6).

III. Formulation et caractérisation de liposomes et d'éthosomes

Ce chapitre vise à élaborer des liposomes et des éthosomes (liposomes formulés en présence d'éthanol) à partir de phospholipides extraits par fluide supercritique de tourteaux d'oléagineux ou de sous-produits d'origine marine. Dans la mesure où les extraits supercritiques ont des compositions complexes et des concentrations variées en PL, une étude préliminaire est menée à partir de lécithines commerciales afin de tester plusieurs paramètres de formulation. Pour chaque préparation, une masse donnée de lécithine ou un volume précis d'une solution éthanolique de concentration en PL connue (cas des extraits supercritiques) est introduit dans un ballon. Dans le cas de la formation de liposomes, l'éthanol éventuellement présent est évaporé jusqu'à ce que l'extrait soit sec. Ensuite, une solution aqueuse est ajoutée au goutte à goutte aux PL ou à la lécithine et l'ensemble est agité. L'arrêt de l'ajout de l'eau se fait à l'obtention de la concentration finale en PL ou en lécithine souhaitée. Dans le cas de la préparation d'éthosomes, l'eau est ajoutée au goutte à goutte à une suspension éthanolique de PL ou de lécithine, jusqu'à l'obtention d'une concentration finale en PL ou en lécithine souhaitée et un pourcentage d'éthanol précis. Les paramètres étudiés sont :

- la concentration en PL (extraits supercritiques) ou en lécithine dans la solution initiale ou dans la suspension finale ;
- le débit d'eau ;
- la concentration volumique d'éthanol ;
- la composition en PL des lécithines commerciales et des extraits supercritiques.

La caractérisation des vésicules lipidiques formées est réalisée par l'association de plusieurs techniques :

- la microscopie optique, permettant de visualiser des objets de taille supérieure à 400 nm, pour déterminer si les objets formés sont isolés ou agrégés ;
- la DLS pour quantifier la présence d'une population inférieure à 300 nm de diamètre (valeur exprimée en diamètre moyen en nombre) ;
- le potentiel zêta qui rend compte de la charge de surface des vésicules phospholipidiques.

III.1 ETUDE PRELIMINAIRE : FORMATION ET CARACTERISATION DE LIPOSOMES A PARTIR DE LECITHINES COMMERCIALES

III.1.1 Influence de la concentration finale en lécithine sur les caractéristiques des liposomes

L'un des objectifs de ce travail de thèse est de former des liposomes à partir des extraits supercritiques. La concentration en phospholipides dans les fractions les plus riches (généralement F2 ou F3) est comprise entre 1 et 8,7 mg.mL⁻¹, ce qui correspond à des quantités de PL de l'ordre de la centaine de milligrammes dans les échantillons. Afin de maîtriser la formation de liposomes avec de telles concentrations de PL, nous avons testé deux concentrations finales de lécithines : 1 et 9,9 mg.mL⁻¹, en utilisant une lécithine de soja commerciale (Lecisoya P97). Le tableau 3.37 présente les résultats des caractéristiques des liposomes obtenus. Dans la gamme de concentrations étudiées, il n'y a pas d'influence de la concentration finale en lipides. Les liposomes obtenus sont de petite taille (diamètre inférieur à 200 nm), et les clichés de microscopie optique ne font pas apparaître d'objets agrégés. Le potentiel zêta est du même ordre de grandeur, ce qui suggère une répartition des PL en surface indépendante de la concentration finale en lipides.

Tableau 3.37 : Influence de la concentration finale en lécithine sur les caractéristiques des liposomes à base de lécithine de soja (Lecisoya P97, débit d'eau : 4,1 mL.min⁻¹).

| Caractérisation | [Lécithines] _{finale} (mg.mL ⁻¹) | |
|-------------------------------|---|--|
| | 1 | 9,9 |
| Diamètre moyen (nm) | 146 ± 94 ^a | 167 – 173 ^b |
| Potentiel zêta (mV) | -42 ± 2,0 | -50 ± 6 |
| Microscopie optique |  |  |

^a Résultats obtenus à partir de trois préparations de liposomes indépendantes.

^b Résultats obtenus à partir de deux préparations de liposomes indépendantes.

III.1.2 Influence de la composition de la lécithine sur les caractéristiques des liposomes

Trois lécithines de composition en lipides différente sont utilisées pour la formulation des liposomes : Lecisoya P97, Lipoïd P30 et LC 60 (Tableau 2.3_Chapitre 2). Le tableau 3.38 présente l'influence de cette composition sur le diamètre moyen des liposomes et leur charge de surface. Le diamètre moyen des particules est de 180 nm environ pour les deux lécithines LC 60 et Lecisoya P97 et diminue sensiblement (130 nm) pour la lécithine Lipoïd P30. Le potentiel zêta décroît significativement pour un pourcentage massique en PL chargés de 29%mass (Lipoïd P30). Par

rapport à la lécithine marine, cette diminution peut s'expliquer par une proportion plus importante de PL chargés. En effet, pour des liposomes contenant 5% de PG (PL présentant une charge nette négative à pH = 7), le potentiel zêta est d'environ -30 mV, tandis que pour 50% de PG, il diminue jusqu'à environ -55 mV (Carrozzino and Khaledi, 2004). Cependant, le potentiel zêta n'est pas simplement lié à la présence de PL chargés. En effet, si certains PL présentent une charge nette négative à pH neutre, tels que PI, PA, PG, PS (-1) et CL (-2) (Li et al., 2015), la phosphatidylcholine peut aussi jouer un rôle dans la charge de surface bien qu'elle soit zwitterionique à pH = 7. Par exemple, des liposomes formulés seulement à partir de 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC) présentent une charge de surface négative (-18 mV pour des MLV et -20 mV pour des LUV à T = 35°C) (Morini et al., 2015). Ce phénomène s'explique par la conformation de la choline qui s'oriente de façon à exposer le groupement phosphate à la surface, dès lors que l'on est au-dessus de la température de transition de phase. Dans notre étude, la PC étant constituée de chaînes d'AG insaturées, on est toujours dans cette configuration. Ainsi, le potentiel zêta plus négatif des liposomes à base de Lipoid P30 résulterait d'un effet cumulé des PL chargés négativement et de la PC.

Tableau 3.38 : Influence de la composition en lipides des lécithines sur le diamètre moyen et le potentiel zêta des liposomes (*Lecisoya P97*, *Lipoid P30* et *LC 60*, débit d'eau : 4,1 mL.min⁻¹, concentration finale en lécithine : 1 mg.mL⁻¹).

| | LC 60 | Lecisoya P97 | Lipoid P30 |
|-----------------------|-----------------------|--------------|------------|
| %mass PL chargés | 3 | 24 | 29 |
| %mass PL chargés + PC | 47 | 43 | 76 |
| Diamètre moyen (nm) | 182 ± 16 ^a | 188 | 130 |
| Potentiel zêta (mV) | -33 ± 1 | -36 | -50 |

^a Résultats obtenus à partir de trois préparations de liposomes indépendantes.
 PL : phospholipides ; PC : phosphatidylcholine

III.2 ETUDE PRELIMINAIRE : FORMATION ET CARACTERISATION D'ETHOSOMES A PARTIR DE LECITHINES COMMERCIALES

Les éthosomes sont préparés suivant le principe de la méthode de coacervation (§ III.3.4-Chapitre 1). Cette méthode repose sur la diminution de la solubilité des composés lipidiques dans le solvant organique par l'ajout au goutte à goutte d'un solvant aqueux. Pour étudier la formation des éthosomes, la lécithine de soja (*Lecisoya P97*) et la lécithine marine (*LC 60*) sont utilisées avec une proportion d'éthanol pouvant monter jusqu'à 30%vol. Ces deux lécithines sont choisies comme modèles des fractions supercritiques extraites de la cameline et des sous-produits de la coquille Saint Jacques.

III.2.1 Influence de la concentration initiale en lécithine sur les caractéristiques des éthosomes

Trois concentrations initiales en lécithine sont testées pour l'étude des caractéristiques des éthosomes. Les essais sont réalisés uniquement à partir de la lécithine de soja pour un pourcentage volumique d'éthanol de 20% et un débit d'eau de 4,1 mL.min⁻¹. Le tableau 3.39 ne montre aucune influence significative de la concentration initiale en lécithine (dans la gamme testée) sur le diamètre des particules (qui se situe autour de 230 nm) ou sur la charge de surface (environ -90 mV). Ces résultats sont en accord avec une étude qui montre qu'une augmentation de la concentration en lécithine de soja d'un facteur 8 (entre 0,5 et 4%) n'a qu'une influence limitée sur le diamètre des éthosomes qui passe de 118 à 249 nm (Touitou et al., 2000). Nos résultats sont en accord avec les diamètres moyens reportés dans l'étude de Jain et collaborateurs (2007) pour des éthosomes à base de lécithine de soja à 15%mass (environ 18%vol) d'éthanol (207 nm) et dans l'étude de Touitou et collaborateurs (2000) pour des éthosomes formés à partir de PC extrait de soja à 20%mass (environ 24%vol) d'éthanol (193 nm).

Tableau 3.39 : Influence de la concentration initiale en lécithine de soja (Lecisoya P97) sur les caractéristiques des éthosomes (20%EtOH ; débit d'ajout d'eau de 4,1 mL.min⁻¹).

| [Lécithines]_{initiale} (mg.mL⁻¹) | 5 | 7,5 | 10 |
|---|----------|------------|-----------------------|
| Diamètre moyen (nm) | 230 | 213 | 211 ± 21 ^a |
| Potentiel zêta (mV) | -95 | -89 | -92 ± 15 |

^a Résultats obtenus à partir de trois préparations de liposomes indépendantes.

III.2.2 Influence du taux d'éthanol sur les caractéristiques des éthosomes

Dans cette partie, les éthosomes sont préparés à partir d'une suspension éthanolique de lécithine de soja (Lecisoya P97) à une concentration initiale de 10 mg.mL⁻¹, à un débit d'eau de 4,1 mL.min⁻¹ et à différents pourcentages volumiques en éthanol (10, 20 et 30). Les résultats sont consignés dans le tableau 3.40.

L'augmentation de l'éthanol de 10 à 30% (vol/vol) s'accompagne d'une diminution de la taille des éthosomes qui passe de 265 nm environ (10%vol EtOH) à 184 nm (30%vol EtOH). En revanche, le potentiel zêta des suspensions ne varie pas de manière très nette avec le taux d'éthanol en tenant compte des écarts-types. La diminution de taille des éthosomes avec l'augmentation du pourcentage d'éthanol a déjà été observée dans d'autres études : de 207 ± 19 nm (15%mass EtOH, soit 18%vol) à 72 ± 11 nm (60%mass EtOH, 66%vol) (Jain et al., 2007). Dans ces études, la valeur du potentiel zêta diminue aussi d'un facteur 5 entre les préparations à 15 et 60% d'éthanol. Ces résultats résulteraient d'une modification de la charge nette des particules suite à une réorganisation des PL membranaires en présence d'éthanol et une stabilisation stérique des têtes polaires au contact du mélange éthanol-

eau (Jain et al., 2007 ; Dubey et al., 2010). Cela entraînerait des interactions répulsives entre les têtes polaires et expliquerait un potentiel zêta de plus en plus négatif (Vierl et al., 1994). Dans notre cas, si la diminution de taille des éthosomes est bien mesurée avec les taux d'éthanol croissants, la variation du potentiel zêta n'est pas observée. Par ailleurs, nos valeurs de potentiel zêta sont environ huit à dix fois plus négatives que celles de Jain et collaborateurs (2007) ainsi que Dubey et collaborateurs (2010). Dans notre cas, la Lecisoya P97 contient 19%mass de PC, mais aussi 24%mass de PL présentant une charge nette négative, tandis que dans les deux articles cités, les éthosomes sont formulés uniquement à partir de PC, PL zwitterionique.

Tableau 3.40 : Influence du taux d'éthanol sur les caractéristiques des éthosomes à base de lécithine de soja (Lecisoya P97 ; débit d'eau : 4,1 mL.min⁻¹ ; concentration finale en PL : 1 mg.mL⁻¹).

| Caractérisation | % EtOH (vol/vol) | | | |
|----------------------------|---------------------|------------------------|-----------|------------|
| | 0 | 10 | 20 | 30 |
| Diamètre moyen (nm) | 188 | 250 – 280 ^a | 211 ± 21 | 184 ± 11 |
| Potentiel zêta (mV) | - 36 | - 89 – - 84 | - 92 ± 15 | - 112 ± 23 |

^a deux préparations d'éthosomes indépendantes.

^b trois préparations d'éthosomes indépendantes.

Si on compare les caractéristiques des liposomes et des éthosomes, on constate que les liposomes ont une taille plus petite que celle observée en présence de 10% d'éthanol. Or, on note que les diamètres de liposomes sont supérieurs à ceux des éthosomes (677 ± 31 nm (Touitou et al., 2000), 388 ± 14 nm (Jain et al., 2007). Néanmoins, ces auteurs préparent les liposomes d'après la méthode de Bangham, c'est à dire en passant par la formation d'un film lipidique avant la phase d'hydratation. Dans notre cas, la même démarche expérimentale est adoptée pour la préparation des liposomes et des éthosomes, ce qui pourrait expliquer les moins grands écarts observés sur les diamètres moyens. La valeur du potentiel zêta pour les liposomes est supérieure à celle des éthosomes et cela quel que soit le pourcentage en éthanol. Ce résultat est cohérent avec l'hypothèse présentée précédemment d'une modification de la charge nette des particules suite à une réorganisation des PL membranaires en présence d'éthanol.

III.2.3 Influence du débit d'eau sur la morphologie des éthosomes

Dans cette partie, les éthosomes sont préparés à partir d'une solution de lécithine de soja (Lecisoya P97) ou lécithine marine (LC 60), de concentration initiale de 10 mg.mL⁻¹. Deux débits d'eau sont testés : 0,7 et 4,1 mL.min⁻¹ (Tableau 3.41). Pour une lécithine donnée, l'augmentation du débit d'eau lors de la préparation des éthosomes n'influence pas significativement le diamètre des particules, ni le potentiel zêta.

Tableau 3.41 : Influence du débit d'eau sur les caractéristiques des éthosomes à base de deux lécithines commerciales différentes (20%EtOH ; concentration finale en lécithine : 1 mg.mL⁻¹).

| | Lecisoya P97 | | LC 60 | |
|------------------------------|-----------------------|----------|----------|----------|
| Débit d'eau | | | | |
| | 0,7 | 4,1 | 0,7 | 4,1 |
| (mL.min⁻¹) | | | | |
| Diamètre moyen | | | | |
| (nm) | 201 ± 40 ^a | 211 ± 21 | 293 ± 76 | 254 ± 32 |
| Potentiel zêta | | | | |
| (mV) | -113 ± 9 | -92 ± 15 | -86 ± 2 | -73 ± 5 |

^a trois préparations d'éthosomes indépendantes

III.2.4 Influence de la composition de la lécithine sur la morphologie des éthosomes

Les résultats présentés dans le tableau 3.42 permettent aussi de discuter de l'influence de la composition en phospholipides des lécithines sur les caractéristiques des éthosomes. La lécithine marine (LC 60) conduit à des éthosomes de taille sensiblement supérieure par rapport à la lécithine de soja. La LC 60 se différencie de la Lecisoya P97 par :

- son faible contenu en PL présentant une charge nette négative (3%mass) ;
- la présence d'acides gras à très longue chaîne (EPA et DHA) estérifiés sur les PL ;
- son contenu en cholestérol (27%mass).

L'ajout de 2%mass de cholestérol à une formulation entraîne une augmentation du diamètre des éthosomes (102 ± 13 nm pour une préparation sans cholestérol ; 152 ± 12 nm avec cholestérol) (Jain et al, 2007). Des résultats similaires sont observés lors de la formulation d'éthosomes à partir de DPPC : 158 ± 35 nm pour une concentration en cholestérol de 6,47 mM et 230 ± 27 nm pour 25,87 mM de cholestérol (Lopez-Pinto et al., 2005). En revanche, la présence de lipides chargés ou d'acides gras à longues chaînes a tendance à augmenter le diamètre des liposomes. Ainsi, la taille des éthosomes résulterait d'une combinaison complexe de paramètres de composition. Contrairement à ce qui a été observé pour les liposomes (Tableau 3.39), l'augmentation de la proportion de phospholipides chargés est associée, pour les deux débits testés, à une diminution de la charge de surface.

En conclusion, ces études préliminaires nous ont permis de maîtriser certains paramètres de préparation et de formulation des liposomes et éthosomes. De manière générale, la méthode utilisée (ajout d'eau à des lipides ou à une solution éthanolique) conduit à des objets de petites tailles (inférieures à 400 nm) empêchant une visualisation des particules par microscopie optique. Parmi les paramètres étudiés, débit d'eau, composition des lécithines commerciales, concentration en lécithine dans la solution initiale ou dans la suspension finale et concentration volumique d'éthanol, seules les compositions en lipides et/ou la proportion d'éthanol ont une influence sensible sur le diamètre des objets et/ou le potentiel zêta mesuré.

III.3 FORMATION DE LIPOSOMES ET ETHOSOMES A PARTIR D'EXTRAITS OBTENUS PAR VOIE SUPERCRITIQUE

Les fractions riches en phospholipides choisies pour la formulation en liposomes et d'éthosomes sont présentées dans le tableau 3.42.

Tableau 3.42 : Pureté, concentration et composition en phospholipides de fractions obtenues par voie supercritique et utilisées pour la préparation des liposomes et éthosomes.

| | EFS Cameline 10 F2 | EFS Cameline 18 F2 | EFS St Jacques 13 F2 |
|---------------------------------|--------------------|--------------------|----------------------|
| Pureté en PL (%) | 24 | 38 | 38 |
| Composition en PL (%mol) | | | |
| PC | 38 | 65 | 20 |
| PCe | - | - | 25 |
| PI | 1 | 6 | 4 |
| LPC | 8 | - | 7 |
| PE | 21 | 23 | 28 |
| PA | 28 | 3 | 3 |
| LPE | 1 | - | 12 |
| PG | 2 | 3 | - |
| LPA | 1 | - | 1 |
| LPG | - | - | 1 |
| % PL chargés | 32 | 12 | 9 |

PL : phospholipides ; (L)PC : (lyso-)phosphatidylcholine ; (L)PI : (lyso-)phosphatidylinositol ; PS : phosphatidylsérine ; (L)PE : (lyso-)phosphatidyléthanolamine ; (L)PA : acide (lyso-)phosphatidique ; (L)PG : (lyso)phosphatidylglycérol ; e : éther.

III.3.1 Influence de la composition des extraits supercritiques sur les caractéristiques des liposomes

Après évaporation de l'éthanol de la fraction et ajout de l'eau au goutte à goutte dans un ballon agité, des objets sont formés de taille d'environ 160 nm (Tableau 3.43). On fait l'hypothèse qu'il s'agit de liposomes. Ainsi, il serait possible de formuler des liposomes à partir des extraits supercritiques même si la pureté en PL n'excède pas 40%. Cela suggère que la présence d'autres molécules n'est pas rédhibitoire à la formation des bicouches.

La composition des fractions n'influence pas la taille des objets (Tableau 3.43). Le diamètre moyen des vésicules est compris entre 162 et 170 nm, même intervalle de valeurs que pour les liposomes à base de lécithine de soja (188 nm) (Tableau 3.39). L'intervalle de valeurs du potentiel zêta est compris entre -51 et -35 mV, même ordre de grandeur que ceux formulés à partir des lécithines commerciales (Tableau 3.39). Dans le cas de la cameline, on note une diminution du potentiel zêta entre les deux fractions qui pourrait provenir d'une proportion importante de PA dans la fraction EFS Cameline 10 F2.

Tableau 3.43 : Influence de la teneur en phospholipides chargés sur les caractéristiques des liposomes (*Extraits supercritiques, débit d'eau 4,1 mL.min⁻¹, [PL]_{finale} = 1 mg.mL⁻¹*).

| | EFS Cameline 10 F2 | EFS Cameline 18 F2 | EFS St Jacques 13 F2 |
|----------------------------------|--------------------|--------------------|----------------------|
| %mass PL chargés | 32 | 12 | 9 |
| %mass PL chargés + espèces de PC | 78 | 77 | 61 |
| Diamètre moyen (nm) | 162 | 171 | 164 |
| Potentiel zêta (mV) | -51 | -35 | -36 |

III.3.2 Caractéristique des éthosomes préparés à partir des extraits supercritiques

Les éthosomes sont préparés à 20% d'éthanol, avec des concentrations initiale en PL de 5 mg.mL⁻¹ et finale de 1 mg.mL⁻¹. Pour une fraction supercritique donnée, on constate qu'une augmentation du débit d'eau entraîne la formation d'objets plus gros et caractérisés par un potentiel zêta moins élevé (Tableau 3.44). On retrouve ce même type de variations pour les trois fractions supercritiques utilisées. Ces résultats ne sont pas en accord avec ce qui a été trouvé précédemment avec les lécithines commerciales, pour lesquelles le débit d'eau n'avait pas d'influence sur la taille des éthosomes formés (Tableau 3.42). Cette différence pourrait provenir de la pureté des fractions qui contiennent d'autres molécules que des lipides et dont la solubilisation pourrait varier en fonction de la vitesse d'ajout d'eau.

Tableau 3.44 : Influence du débit d'eau sur les caractéristiques des éthosomes obtenus à partir de trois extraits supercritiques.

| | EFS Cameline 10 F2 32%mass PL chargés | | EFS Cameline 18 F2 12%mass PL chargés | | EFS St Jacques 13 F2 9%mass PL chargés | |
|-------------------------------------|--|-----------|--|-----|---|-----|
| Débit d'eau (mL.min ⁻¹) | 0,7 | 4,1 | 0,7 | 4,1 | 0,7 | 4,1 |
| Diamètre moyen des particules (nm) | 78 | 208 – 215 | 177 | 248 | 152 | 215 |
| Potentiel zêta (mV) | -135 | -93 - -74 | -99 | -73 | -85 | -68 |

EFS : extraction par fluide supercritique ; PL : phospholipides ; mass : masse

Dans le cas des éthosomes formulés à partir des extraits supercritiques, et un débit de 0,7 mL.min⁻¹, il semble que la composition en PL influence le diamètre moyen et la charge de surface des éthosomes (Tableau 3.44). Cette influence sur la taille des éthosomes est moins nette pour les objets obtenus avec un débit de 4,1 mL.min⁻¹. Les valeurs du potentiel zêta deviennent plus négatives quand la quantité en PL chargés augmente.

III.3.4 Comparaison des caractéristiques des liposomes et des éthosomes (à 20% d'éthanol) préparés à partir d'une même fraction supercritique

La comparaison des caractéristiques entre les liposomes et éthosomes formulés à partir des fractions supercritiques est présentée dans tableau 3.45. Quelle que soit la fraction supercritique considérée, le diamètre des liposomes est toujours inférieur à celui des éthosomes. Ce résultat a aussi été observé pour les liposomes/éthosomes formés à partir des lécithines commerciales, Lecisoya P97 et LC 60 (Tableau 3.41). De plus, le potentiel zêta, compris entre -35 mV et -93 mV, diminue en présence d'éthanol. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus dans le cas de l'étude des lécithines commerciales pour lesquelles le potentiel zêta est compris entre -112 et -36 mV dans le cas de lécithine de soja et entre -73 et -33 mV dans le cas de la lécithine marine.

Tableau 3.45 : Comparaison des caractéristiques des liposomes et éthosomes (20%vol) basés sur des PL extraits par SC (débit d'eau : 4,1 mL.min⁻¹).

| Nom de l'extrait | EFS Cameline 10 F2 | | EFS Cameline 18 F2 | | EFS St Jacques 13 F2 | |
|---|--------------------|-----------|--------------------|-----|----------------------|-----|
| EtOH (%vol) | 0 | 20 | 0 | 20 | 0 | 20 |
| Diamètre moyen des particules (nm) | 80 – 162 | 208 – 215 | 171 | 248 | 164 | 215 |
| Potentiel zêta (mV) | -65 - -51 | -93 - -74 | -35 | -73 | -42 | -68 |

EFS : extraction par fluide supercritique ; EtOH : éthanol.

Il est donc faisable de préparer des objets à base des extraits supercritiques que ce soit sous forme de liposomes ou d'éthosomes, et ce malgré le fait que la proportion en phospholipides des extraits n'excède pas 38%. Dans tous les cas, les objets obtenus se caractérisent par un diamètre moyen (en nombre) inférieur à 300 nm. La charge de surface des liposomes est comprise entre -51 et -33 mV et semble être influencée par une teneur en PL chargés. La présence d'éthanol dans le milieu exacerbe cette charge de surface négative (-135 à -73 mV). Contrairement à ce qui est observé avec les lécithines commerciales, des paramètres opératoires tels que le débit d'eau, ont une influence sur les caractéristiques des liposomes et des éthosomes formés à partir des extraits supercritiques. Cela suggère que les molécules autres que les PL jouent un rôle dans la structuration des membranes.

Conclusion et perspectives

Actuellement, les lécithines commerciales sont extraites d'un nombre limité de matrices végétales (soja, tournesol, colza) ou animales (œuf et lait). Elles se caractérisent par des compositions en phospholipides variées mais contiennent peu d'AGPI n-3. Seules les lécithines extraites des sources marines (krill) présentent un profil en AGPI n-3 intéressant avec une quantité d'EPA et de DHA importante (plus de 40% des AG totaux). Par ailleurs, les méthodes industrielles d'extraction des PL employées aujourd'hui sont basées essentiellement sur l'utilisation de solvants organiques. Or, dans un contexte de développement durable, la réduction et/ou la suppression des solvants organiques est largement préconisée. De plus, les politiques environnementales actuelles sont en faveur d'une réduction drastique des déchets issus de l'agroalimentaire par une valorisation au niveau industriel de ces derniers.

Le premier objectif de ce travail de thèse a été d'identifier de nouvelles sources de phospholipides qui soient également riches en AGPI n-3. Dans un souci de valorisation de co- et sous-produits, diverses sources potentielles sont étudiées : les tourteaux d'oléagineux et les sous-produits de la coquille Saint Jacques. Parmi l'ensemble des tourteaux étudiés, le tourteau de cameline est retenu. En effet, il est le tourteau étudié le plus riche en PL (environ 1 g de PL pour 100 g de matière sèche) avec une teneur en AGPI n-3 estérifiée dans les PL supérieure à 15% des AG totaux, quantité supérieure à ce que l'on trouve dans les lécithines végétales commerciales. La coquille Saint Jacques, déjà étudiée comme matrice potentielle, se révèle être intéressante par sa teneur en PL de 1,8 g de PL pour 100 g de matière sèche et sa composition en AGPI n-3 à longues chaînes (10% d'EPA et 22% de DHA estérifiés dans les PL). Outre ces teneurs en PL et AG, nous avons pu acquérir de nouvelles données de composition en lipides (classes et espèces de PL, acylglycérols, esters de stérol, acides gras libres) qui peuvent être utiles pour la valorisation des tourteaux végétaux. Ces caractérisations ont nécessité le développement analytique de méthodes complémentaires et la mise en place de collaborations au sein de différentes équipes de recherche.

Avec l'objectif d'extraire les PL de ces sous-produits sans utiliser de solvants organiques, nous nous sommes ensuite attachés à déterminer quelles conditions opératoires sont les plus favorables à l'obtention d'extraits riches et/ou purs en PL. L'ensemble des expérimentations menées utilise du CO₂ supercritique comme fluide principal et l'éthanol comme co-solvant. Malgré les contraintes techniques (limite de pression maximale : 25 MPa, débit maximum de 16,5 g.min⁻¹, taille maximale du réacteur : 490 mL), nous avons pu déterminer les meilleures conditions pour extraire les phospholipides des matrices végétales et animale. L'utilisation de 7%mass d'éthanol dans le fluide permet d'extraire la majorité des lipides neutres et des acides gras libres, puis l'augmentation à 27%mass d'éthanol permet d'extraire plus de la moitié des PL contenus dans la matrice (entre 250 – 400 mg de PL pour le cas des tourteaux de cameline dans le réacteur de 100 mL). De plus, le protocole avec gradient d'éthanol permet d'améliorer la pureté en PL dans les fractions (24 à 51%mass de la masse totale de la fraction) par rapport au protocole à taux fixe en éthanol. Le procédé d'extraction des PL par voie supercritique apparaît donc comme une alternative intéressante aux techniques conventionnelles. En effet, outre le respect de l'environnement, ce procédé permet de travailler à des températures modérées préservant les molécules thermolabiles. Cependant, il nécessite un investissement

important en terme d'équipements et un prétraitement de la matière première (tel que la déshydratation et/ou le broyage et un déshuilage). Par la suite, le coût de fonctionnement est faible, car les étapes d'élimination ou de recyclage du solvant organique sont supprimées.

Le dernier objectif de ce travail de thèse est de montrer que la diversité en composition des extraits supercritiques obtenus permet d'obtenir des liposomes/éthosomes aux caractéristiques physico-chimiques variées. Ainsi, à partir des phospholipides extraits par fluide supercritiques, bien que la pureté dans les extraits soit généralement inférieure à 50% de la matière extraite, il est possible de former des objets dans un milieu aqueux contenant ou non de l'éthanol. Ces objets que nous avons supposés être des liposomes/éthosomes par comparaison avec les vésicules obtenues à partir de lécithines commerciales se caractérisent par un diamètre moyen (en nombre) inférieur à 300 nm et une charge de surface inférieure à -30 mV. Il est intéressant de noter que la présence d'autres molécules (lipidiques et non lipidiques) dans les extraits ne semble pas empêcher la formation des objets.

Les différentes conclusions obtenues par cette étude soulèvent de nouvelles questions, ouvrant ainsi plusieurs perspectives. L'étude de deux tourteaux de cameline de différente origine a mis en évidence la différence de composition des classes de PL. Il est vraisemblable que cette différence provienne des conditions de trituration et de stockage des tourteaux. Une étude de l'influence des conditions de trituration et de stockage (présence ou absence d'oxygène, température, présence ou absence de lumière, temps de stockage ...) sur la composition en PL permettrait de limiter la variabilité des compositions des extraits. Les lipides totaux extraits des tourteaux végétaux présentent une composition complexe. Il serait intéressant de continuer à approfondir ces connaissances par la quantification des molécules anti-oxydantes (tocophérols par exemple) de manière à s'assurer que ces molécules se retrouvent aussi dans les extraits supercritiques, associées aux PL insaturés. Ensuite, pour poursuivre la validation d'un intérêt industriel de l'extraction des PL par fluide supercritique, il faudrait poursuivre le travail de scale-up abordé dans ce manuscrit et maîtriser, sur des lots de matière plus importants, la sélectivité de l'extraction des PL en jouant, par exemple, sur la pression ou le débit du fluide extractant. Par ailleurs, une quantification plus approfondie des molécules lipidiques et non lipidiques contenues dans les fractions est indispensable. Enfin, en ce qui concerne les vésicules lipidiques, la caractérisation par microscopie électronique à transmission ou par RMN permettrait d'affiner les résultats obtenus avec les lécithines commerciales et de confirmer la présence de structures lamellaires obtenues avec les extraits supercritiques. Des études de stabilité chimique (oxydation) et physique (agrégation) sont aussi à prévoir. Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons privilégié une méthode de préparation des éthosomes par ajout d'eau aux extraits supercritiques éthanoliques, la préparation étant réalisée à pression ambiante. Il serait possible d'ajouter l'eau directement en sortie du réacteur d'extraction, toujours sous pression, de façon à former les éthosomes lors de la détente du fluide. On aurait ainsi couplé les étapes d'extraction et de formulation.

En conclusion, compte-tenu de la demande croissante en phospholipides et de la forte valeur ajoutée de ces molécules, leur extraction par voie supercritique, à partir de sous produits d'origine

végétale ou animale bien choisis, serait intéressante à développer à l'échelle industrielle. L'utilisation des liposomes formulés à partir de ces phospholipides pourrait être préconisée pour améliorer la biodisponibilité des AGPI n-3 dans des applications nutritionnelles, tandis que les éthosomes pourraient être utilisés pour vectoriser des principes actifs par voie topique, pour des applications cosmétiques et pharmaceutiques.

Références

- Abou-Gharbia, H.A., Shehata, A.A.Y., Shahidi, F., 2000. Effect of processing on oxidative stability and lipid classes of sesame oil. *Food Res. Int.* 33, 331–340.
- Acosta, G., M., Hou, F., Drake, B., D., Smith Jr, R., L., 1994. Supercritical extraction of fat from phospholipid biomembrane structures. *J. of Super. Fluids.* 7, 191–196.
- Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S.W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., Samiei, M., Kouhi, M., Nejati-Koshki, K., 2013. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett* 8, 102–111.
- Åkerlöf G., 1932. Dielectric constants of some organic solvent-water mixtures at various temperatures. *J. Am. Chem. Soc.* 54, 4138–4139.
- Aladic, K., Jokić, S., Moslavac, T., Tomas, S., Vidović, S., Vladić, J., Šubarić, D., 2014. Cold pressing and supercritical CO₂ extraction of hemp (*Cannabis sativa*) seed oil. *Chem. Biochem. Eng. Q.* 28, 481–490.
- Alimentarius, C., 1999. Codex standard for named vegetable oils. *Codex Stan* 210, 1–13.
- Ames, B.N., 1966. Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatase, *Methods Enzymol.* 18, 115–118.
- Andersen, S., Christophersen, G., Magnesen, T., 2011. Spat production of the great scallop (*Pecten maximus*): a roller coaster. This review is part of a virtual symposium on current topics in aquaculture of marine fish and shellfish. *Can. J. Zool.* 89, 579–598.
- Angelova-Romova, M., Zlatanov, M., Antova, G., Momchilova, S., Blagoeva, E., Nikolova, M., 2013. Phospholipids content and composition of hazelnut and walnut cultivars grown in Bulgaria. *Comptes Rendus L'Académie Bulg. Sci.* 66, 1689–1694.
- Aro, H., Järvenpää, E., Könkö, K., Huopalahti, R., Hietaniemi, V., 2007. The characterisation of oat lipids produced by supercritical fluid technologies. *J. Cereal Sci.* 45, 116–119.
- Aro, H., Järvenpää, E.P., Könkö, K., Sihvonen, M., Hietaniemi, V., Huopalahti, R., 2009. Isolation and purification of egg yolk phospholipids using liquid extraction and pilot-scale supercritical fluid techniques. *Eur. Food Res. Technol.* 228, 857–863.
- Avalli, A., Contarini, G., 2005. Determination of phospholipids in dairy products by SPE/HPLC/ELSD. *J. Chromatogr. A* 1071, 185–190.
- Bada, J.C., León-Camacho, M., Prieto, M., Copovi, P., Alonso, L., 2010. Characterization of walnut oils (*Juglans regia* L.) from Asturias, Spain. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 87, 1469–1474.
- Bangham, A.D., 1978. Properties and uses of lipid vesicles: an overview. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 308, 2–7.
- Betz, G., Aeppli, A., Menshutina, N., Leuenberger, H., 2005. In vivo comparison of various liposome formulations for cosmetic application. *Int. J. Phar.* 296, 44–54.
- Bonamin, F., Moraes, T.M., dos Santos, R.C., Kushima, H., Faria, F.M., Silva, M.A., Junior, I.V., Nogueira, L., Bauab, T.M., Souza Brito, A.R.M., da Rocha, L.R.M., Hiruma-Lima, C.A., 2014. The

- effect of a minor constituent of essential oil from *Citrus aurantium*: The role of β -myrcene in preventing peptic ulcer disease. *Chem. Biol. Interact.* 212, 11–19.
- Boselli, E., Caboni, M.F., 2000. Supercritical carbon dioxide extraction of phospholipids from dried egg yolk without organic modifier. *J. Supercrit. Fluids* 19, 45–50.
- Brunner, G., 2005. Supercritical fluids: technology and application to food processing. *J. Food Eng.* 67, 21–33.
- Budin, J.T., Breene, W.M., Putnam, D.H., 1995. Some compositional properties of camelina (*Camelina sativa* L. Crantz) seeds and oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 72, 309–315.
- Bulley, N.R., Labay, L., Arntfield, S.D., 1992. Extraction/fractionation of egg yolk using supercritical CO₂ and alcohol entrainers. *J. Supercrit. Fluids* 5, 13–18.
- Buré, C., Solgadi, A., Yen-Nicolay, S., Bardeau, T., Libong, D., Abreu, S., Chaminade, P., Subra-Paternault, P., Cansell, M., 2016. Electrospray mass spectrometry as a tool to characterize phospholipid composition of plant cakes. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 118.
- Buré, C., Ayciriex, S., Testet, E., Schmitter, J.-M., 2013. A single run LC-MS/MS method for phospholipidomics, *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 203–213.
- Cabezas, D.M., Eestefania, G.N., Diehl Bernd W.K., T.M.C., 2013. Antioxidant and emulsifying properties of modified sunflower lecithin by fractionation with ethanol-water mixtures, in: Muzzalupo, I. (Ed.), *Food Industry. InTech.*, Chap 25, 589–602.
- Callaway, J.C., 2010. Hempseed oil in a nutshell. *Inform* 3, 130–132.
- Cansell, M., 2007. Use of egg compounds for cosmetics and pharmaceuticals, in: *Bioactive Egg Compounds*. Springer, pp. 249–257.
- Cansell, M., 2010. Marine phospholipids as dietary carriers of long-chain polyunsaturated fatty acids. *Lipid Technol.* 22, 223–226.
- Cao, X., Ito, Y., 2003. Supercritical fluid extraction of grape seed oil and subsequent separation of free fatty acids by high-speed counter-current chromatography. *J. Chromatogr. A* 1021, 117–124.
- Carnielli, V.P., Verlato, G., Pederzini, F., Luijendijk, I., Boerlage, A., Pedrotti, D., Sauer, P.J., 1998. Intestinal absorption of long-chain polyunsaturated fatty acids in preterm infants fed breast milk or formula. *Am. J. Clin. Nutr.* 67, 97–103.
- Carrozzino, J.M., Khaledi, M.G., 2004. Interaction of basic drugs with lipid bilayers using liposome electrokinetic chromatography. *Phar. Res.* 21, 2327–2335.
- Cartea, M.E., Velasco, P., 2008. Glucosinolates in Brassica foods: bioavailability in food and significance for human health. *Phytochem. Rev.* 7, 213–229.
- Catchpole, O.J., Tallon, S.J., Eltringham, W.E., Grey, J.B., Fenton, K.A., Vagi, E.M., Vyssotski, M.V., MacKenzie, A.N., Ryan, J., Zhu, Y., 2009. The extraction and fractionation of specialty lipids using near critical fluids. *J. Supercrit. Fluids* 47, 591–597.

- Ceci, L.N., Constenla, D.T., Crapiste, G.H., 2008. Oil recovery and lecithin production using water degumming sludge of crude soybean oils. *J. Sci. Food Agric.* 88, 2460–2466.
- Cheung P.C.K., 1999. Temperature and pressure effects on supercritical carbon dioxide extraction of n-3 fatty acids from red seaweed. *Food Chem.* 65, 399–403.
- Choo, W.-S., Birch, J., Dufour, J.-P., 2007. Physicochemical and quality characteristics of cold-pressed flaxseed oils. *J. Food Compos. Anal.* 20, 202–211.
- Christopoulos, M.V., Tsantili, E., 2015. Oil composition in stored walnut cultivars-quality and nutritional value: Oil composition in stored walnut cultivars. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 117, 338–348.
- Cocero, M.J., Calvo, L., 1996. Supercritical fluid extraction of sunflower seed oil with CO₂-ethanol mixtures. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73, 1573–1578.
- Cole, L.K., Vance, J.E., Vance, D.E., 2012. Phosphatidylcholine biosynthesis and lipoprotein metabolism. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1821, 754–761.
- Crews, C., Hough, P., Brereton, P., Godward, J., Lees, M., Guiet, S., Winkelmann, W., 2006. Quantitation of the main constituents of some authentic sesame seed oils of different origin. *J. Agric. Food Chem.* 54, 6266–6270.
- Cunnane, S.C., Ganguli, S., Menard, C., Liede, A.C., Hamadeh, M.J., Chen, Z.-Y., Wolever, T., Jenkins, D.J., 1993. High α -linolenic acid flaxseed (*Linum usitatissimum*): some nutritional properties in humans. *Br. J. Nutr.* 69, 443–453.
- Daun, J. K., Barthet, V. J., Chornick, T. L., Duguid, S., 2003. Structure, composition, and variety development of flaxseed. *Flaxs. In Hum. Nut.* 1–40.
- Dayan, N., Touitou, E., 2000. Carriers for skin delivery of trihexyphenidyl HCl: ethosomes vs. liposomes. *Biomaterials* 21, 1879–1885.
- Désormeaux, A., Bergeron, M.G., 1998. Liposomes as drug delivery system: a strategic approach for the treatment of HIV infection. *J. Drug Target.* 6, 1–15.
- Dua, J.S., Rana, A.C., Bhandari, A.K., 2012. Liposome: methods of preparation and applications. *Int. J. Pharm. Stud. Res.* 3, 14–20.
- Dubey, V., Mishra, D., Nahar, M., Jain, V., Kumar, Jain, N.K., 2010. Enhanced transdermal delivery of an anti-HIV agent via ethanolic liposomes. *Nanomed: Nanotech. Bio. Med.* 6, 590–596.
- Dunford, N.T., Temelli, F., 1995. Extraction of phospholipids from canola with supercritical carbon dioxide and ethanol. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 72, 1009–1015.
- Ekinci, M.S., Gürü, M., 2014. Extraction of oil and β -sitosterol from peach (*Prunus persica*) seeds using supercritical carbon dioxide. *J. Supercrit. Fluids* 92, 319–323.
- Elleuch, M., Besbes, S., Roiseux, O., Blecker, C., Attia, H., 2007. Quality characteristics of sesame seeds and by-products. *Food Chem.* 103, 641–650.
- Estrada, R., Stolorowich, N., Yappert, M.C., 2008. Influence of temperature on ³¹P NMR chemical shifts

- p>of phospholipids and their metabolites I. In chloroform–methanol–water.
- Anal. Biochem.*
- 380, 41–50.
- Fattori, M., Bulley, N.R., Meisen, A., 1988. Carbon dioxide extraction of canola seed: oil solubility and effect of seed treatment. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 65, 968–974.
- Folch, J., Lees, M., Slone Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. of Biol. Chem.* 497–509
- Follegatti-Romero, L.A., Piantino, C.R., Grimaldi, R., Cabral, F.A., 2009. Supercritical CO₂ extraction of omega-3 rich oil from Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) seeds. *J. Supercrit. Fluids* 49, 323–329.
- Franzen, U., Østergaard, J., 2012. Physico-chemical characterization of liposomes and drug substance–liposome interactions in pharmaceuticals using capillary electrophoresis and electrokinetic chromatography. *J. Chromatogr. A* 1267, 32–44.
- Friedrich, J.P., Pryde, E.H., 1984. Supercritical CO₂ extraction of lipid-bearing materials and characterization of the products. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 61, 223–228.
- Ganem-Quintanar, A., Kalia, Y.N., Falson-Rieg, F., Buri, P., 1997. Mechanisms of oral permeation enhancement. *Int. J. Pharm.* 156, 127–142.
- Gerits, L.R, Pareyt, B., Delcour, J.A, 2013. Single run HPLC separation coupled to evaporative light scattering detection unravels wheat flour endogenous lipid redistribution during bread dough making. *Food SC. Tech.* 53, 426–433.
- Gharibzahedi, S.M.T., Mousavi, S.M., Hamed, M., Rezaei, K., Khodaiyan, F., 2013. Evaluation of physicochemical properties and antioxidant activities of Persian walnut oil obtained by several extraction methods. *Ind. Crops Prod.* 45, 133–140.
- Gładkowski, W., Kielbowicz, G., Chojnacka, A., Gil, M., Trziszka, T., Dobrzański, Z., Wawrzeńczyk, C., 2011. Fatty acid composition of egg yolk phospholipid fractions following feed supplementation of Lohmann Brown hens with humic-fat preparations. *Food Chem.* 126, 1013–1018.
- Gómez-Hens, A., Fernández-Romero, J., 2006. Analytical methods for the control of liposomal delivery systems. *Trends Anal. Chem.* 25, 167–178.
- Gregoriadis, G., Leathwood, P.D., Ryman, B.E., 1971. Enzyme entrapment in liposomes. *FEBS Lett.* 14, 95–99.
- Gregory, A.E., Titball, R., Williamson, D., 2013. Vaccine delivery using nanoparticles. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3.
- Gribbestad, I.S., Aursand, M., Martinez, I., 2005. High-resolution ¹H magnetic resonance spectroscopy of whole fish, fillets and extracts of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) for quality assessment and compositional analyses. *Aquaculture* 250, 445–457.
- Güçlü-Üstündağ, Temelli, F., 2000. Correlating the solubility behavior of fatty acids, mono-, di-, and triglycerides, and fatty acid esters in supercritical carbon dioxide. *Ind. Eng. Chem. Res.* 39, 4756–4766.

- Guo, Z., Vikbjerg, A.F., Xu, X., 2005. Enzymatic modification of phospholipids for functional applications and human nutrition. *Biotechnol. Adv.* 23, 203–259.
- Gutiérrez, C., Rubilar, M., Jara, C., Verdugo, M., Sineiro, J., Shene, C., 2010. Flaxseed and flaxseed cake as a source of compounds for food industry. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 10, 454–463.
- Haddad, E.H., Gaban-Chong, N., Oda, K., Sabaté, J., 2014. Effect of a walnut meal on postprandial oxidative stress and antioxidants in healthy individuals. *Nutr J* 13.
- Hammam, H., 1992. Solubilities of pure lipids in supercritical carbon dioxide. *J. Supercrit. Fluids* 5, 101–106.
- Hanif, M., Atsuta, Y., Fujie, K., Daimon, H., 2010. Supercritical fluid extraction of microbial phospholipid fatty acids from activated sludge. *J. Chromatogr. A* 1217, 6704–6708.
- Hatzakis, E., Koidis, A., Boskou, D., Dais, P., 2008. Determination of phospholipids in olive oil by ^{31}P NMR spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 56, 6232–6240.
- Henna Lu, F.S., Nielsen, N.S., Timm-Heinrich, M., Jacobsen, C., 2011. Oxidative stability of marine phospholipids in the liposomal form and their applications. *Lipids* 46, 3–23.
- Herchi, W., Sakouhi, F., Khaled, S., Xiong, Y., Boukhchina, S., Kallel, H., Curtis, J.M., 2011. Characterisation of the glycerophospholipid fraction in flaxseed oil using liquid chromatography–mass spectrometry. *Food Chem.* 129, 437–442.
- Ho, C.H.L., Cacace, J.E., Mazza, G., 2007. Extraction of lignans, proteins and carbohydrates from flaxseed meal with pressurized low polarity water. *LWT - Food Sci. Technol.* 40, 1637–1647.
- Hollo, J., Peredi, J., Ruzics, A., Jeránek, M., Erdélyi, A., 1993. Sunflower lecithin and possibilities for utilization. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 70, 997–1001.
- Hruschka, S.M., Kirchner, S., Rassenhovel, J., Witt, W., Gusek, T.W., Efstathiou, J.D., 2009. Solvent extraction using water, alcohol mixture. Google Patents.
- Huang, Z., Li, X., Zhang, T., Song, Y., She, Z., Li, J., Deng, Y., 2014. Progress involving new techniques for liposome preparation. *Asian J. Pharm. Sci.* 9, 176–182.
- Ifremer, Farines et huiles brutes de poisson, août 2010, www.bibliomer.com
- Ifremer, Huiles de poissons raffinées, octobre 2010, www.bibliomer.com
- Igarashi, T., Aursand, M., Hirata, Y., Gribbestad, I.S., Wada, S., Nonaka, M., 2000. Nondestructive quantitative determination of docosahexaenoic acid and n-3 fatty acids in fish oils by high-resolution ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77, 737–748.
- Imbert, L., Ramos, R.G., Libong, D., Abreu, S., Loiseau, P.M., Chaminade, P., 2012. Identification of phospholipid species affected by miltefosine action in *Leishmania donovani* cultures using LC-ELSD, LC-ESI/MS, and multivariate data analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* 402, 1169–1182.
- Ishii, F., Takamura, A., Ishigami, Y., 1995. Procedure for preparation of lipid vesicles (liposomes)

- using the coacervation (phase separation) technique. *Langmuir* 11, 483–486.
- Ishii, K., Okajima, H., Okada, Y., Watanabe, H., 1988. Studies on furan acids of salmon roe phospholipids. *J. Biochem.* 103, 836–839.
- Jain, S., Tiwary, A.K., Sapra, B., Jain, N.K., 2007. Formulation and evaluation of ethosomes for transdermal delivery of lamivudine. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 8, 249–257.
- Johnsson, P., Peerlkamp, N., Kamal-Eldin, A., Andersson, R.E., Andersson, R., Lundgren L. N., Åmana P., 2002. Polymeric fractions containing phenol glucosides in flaxseed. *Food Chem.* 76, 207–212.
- Joseph, J.D., 1982. Lipid composition of marine and estuarine invertebrates. Part II: Mollusca. *Prog. Lipid Res.* 21, 109–153.
- Kaffarnik, S., Ehlers, I., Gröbner, G., Schleucher, J., Vetter, W., 2013. Two-dimensional ^{31}P , ^1H NMR spectroscopic profiling of phospholipids in cheese and fish. *J. Agric. Food Chem.* 61, 7061–7069.
- Kamal-Eldin, A., Appelqvist, L. A., 1994. Variation in fatty acid composition of the different acyl lipids in seed oils from four *Sesamum* species. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71, 135–139.
- Kamal-Eldin, A., Appelqvist, L.A., 1994. Variations in the composition of sterols, tocopherols and lignans in seed oils from four *Sesamum* species. *JAOCS.* 71, 149–156.
- Kanu, P.J., Bahsoon, J.Z., Kanu, J.B., Kandeh, J.B., 2010. Nutraceutical importance of sesame seed and oil: A review of the contribution of their lignans. *Sierra Leone J. Biomed. Res.* 2, 4–16.
- Karaman, S., Karasu, S., Tornuk, F., Toker, O.S., Geçgel, Ü., Sagdic, O., Ozcan, N., Gül, O., 2015. Recovery potential of cold press byproducts obtained from the edible oil industry: physicochemical, bioactive, and antimicrobial properties. *J. Agric. Food Chem.* 63, 2305–2313.
- Karleskind, A., 1992. Manuel des corps gras, Tome 2. Tec & Doc., 1500 pages
- Keller, B.C., 2001. Liposomes in nutrition. *Trends Food Sci. Technol.* 12, 25–31.
- Khattab I. S., Bandarkar F., Fakhree M. A. A., Jouyban A., 2012. Density, viscosity, and surface tension of water+ethanol mixtures from 293 to 323 K. *Korean J. Chem. Eng.* 29, 812–817.
- Kirjavainen, M., Urtti, A., Jääskeläinen, I., Suhonen, T. M, Paronen, P., Valjakka-Koskela, R., Kiesvaara, J., Mönkkönen, J., 1996. Interaction of liposomes with human skin in vitro – the influence of lipid composition and structure. *Biochim. and Biophys. Acta.* 1304, 179–189.
- Kirkhus, B., Lundon, A.R., Haugen, J.-E., Vogt, G., Borge, G.I.A., Henriksen, B.I.F., 2013. Effects of environmental factors on edible oil quality of organically grown *Camelina sativa*. *J. Agric. Food Chem.* 61, 3179–3185.
- Kolodner, P., Williams, H., Moe, C., 1988. Optical measurement of the Soret coefficient of ethanol/water solutions. *J. Chem. Phys.* 88, 6512–6524.
- Koprivnjak, O., Škevin, D., Valić, S., Majetić, V., Petričević, S., Ljubenković, I., 2008. The antioxidant capacity and oxidative stability of virgin olive oil enriched with phospholipids. *Food Chem.* 111, 121–

126.

Kraffe, E., Soudant, P., Marty, Y., 2006. cis-4, 7, 10, trans-13–22: 4 fatty acid distribution in phospholipids of pectinid species *Aequipecten opercularis* and *Pecten maximus*. *Lipids* 41, 491–497.

Kramer, J.K.G., Sauer, F.D., Wolynetz, M.S., Farnworth, E.R., Johnston, K.M., 1992. Effects of dietary saturated fat on erucic acid induced myocardial lipidosis in rats. *Lipids* 27, 619–623.

Kuk, M.S., Hron Sr, R.J., 1994. Supercritical carbon dioxide extraction of cottonseed with co-solvents. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71, 1353–1356.

Küllenberg, D., Taylor, L.A., Schneider, M., Massing, U., 2012. Health effects of dietary phospholipids. *Lipids Health Dis.* 11, 1–16.

Lauritzen, L., Hansen, H.S., Jorgensen, M.H., Michaelsen, K.F., 2001. The essentiality of long chain n-3 fatty acids in relation to development and function of the brain and retina. *Prog. in Lip. Res.* 40, 1–94.

Lefur, A., Arnaud, J.-P., 2004. Les lipides polaires : actifs et vecteurs cosmétiques. *O.C.L.* 11, 436–439.

Lefur, A., Bezivin, C., Lepais, M., Cottin P., 2008, Phospholipides et dispersions pigmentaires. *Parfums cosmétiques actualités* N°202, 75–81.

Leizer, C., Ribnicky, D., Poulev, A., Dushenkov, S., Raskin, I., others, 2000. The composition of hemp seed oil and its potential as an important source of nutrition. *J. Nutraceuticals Funct. Med. Foods* 2, 35–54.

Le Pennec, G., Le Pennec, M., Beninger, G., 2001. Seasonal digestive gland dynamics of the scallop *Pecten maximus* in the Bay of Brest (France). *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 81, 663–671.

Leray, C., 2010. Les lipides dans le monde du vivant : introduction à la lipidomique. Broch, 282 pages.

Lesoin, L., 2011, Formation de liposomes par un procédé innovant utilisant les fluides supercritiques. Université Paul Cézanne. p.173.

Li, J., Wang, X., Zhang, T., Wang, C., Huang, Z., Luo, X., Deng, Y., 2015. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian J. Pharm. Sci.* 10, 81–98.

Liu, D., Ma, F., 2011. Soybean phospholipids. INTECH Open Access Publisher.

Lopez-Pinto, J.M., Gonzalez-Rodriguez M.L., Rabasco, A.M., 2005. Effect of cholesterol and ethanol on dermal delivery from DPPC liposomes. *Int. J. Phar.* 298, 1–12.

Lorin, A., Flore, C., Thomas, A., Brasseur, R., 2004. Les liposomes : description, fabrication et applications. *Biotechnol. Agron. Société Environ.* 8, 163–176.

Mailer, R.J., McFadden, A., Ayton, J., Redden, B., 2008. Anti-nutritional components, fibre, sinapine and glucosinolate content, in australian canola (*Brassica napus* L.) meal. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 85, 937–944.

- Mansour, M., Shrestha, P., Belide, S., Petrie, J., Nichols, P., Singh, S., 2014. Characterization of oilseed lipids from “DHA-producing *Camelina sativa*”: a new transformed land plant containing long-chain omega-3 oils. *Nutrients* 6, 776–789.
- Marin, M., Rene, F., 2000. Lyophilisation. *Tech. Ing. Agroaliment.* 2, F3240–1.
- Marsanasco, M., Márquez, A.L., Wagner, J.R., del V. Alonso, S., Chiaramoni, N.S., 2011. Liposomes as vehicles for vitamins E and C: An alternative to fortify orange juice and offer vitamin C protection after heat treatment. *Food Res. Int.* 44, 3039–3046.
- Martínez, J., Carolina de Aguiar, A., 2014. Extraction of triacylglycerols and fatty acids using supercritical fluids - Review. *Curr. Anal. Chem.* 10, 67–77.
- Martínez, M.L., Mattea, M.A., Maestri, D.M., 2008. Pressing and supercritical carbon dioxide extraction of walnut oil. *J. Food Eng.* 88, 399–404.
- Massing, U., Cicko, S., Zirolì, V., 2008. Dual asymmetric centrifugation (DAC)—A new technique for liposome preparation. *J. Controlled Release* 125, 16–24.
- Massiot, D., Fayon, F., Capron, M., King, I., Le Calvé, S., Alonso, B., Durand, J.-O., Bujoli, B., Gan, Z., Hoatson, G., 2002. Modelling one-and two-dimensional solid-state NMR spectra. *Magn. Reson. Chem.* 40, 70–76.
- Matthäus, B., Brühl, L., 2008. Virgin hemp seed oil: An interesting niche product. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 110, 655–661.
- Matthäus, B., Zubr, J., 2000. Variability of specific components in *Camelina sativa* oilseed cakes. *Ind. Crops Prod.* 12, 9–18.
- Mazur, W., Adlercreutz, H., 1998. Naturally occurring oestrogens in food. *Pure Appl. Chem.* 70, 1759–1776.
- Meagher, L.P., Beecher, G.R., Flanagan, V.P., Li, B.W., 1999. Isolation and characterization of the lignans, isolariciresinol and pinoresinol, in flaxseed meal. *J. Agric. Food Chem.* 47, 3173–3180.
- Meure, L.A., Foster, N.R., Dehghani, F., 2008a. Conventional and dense gas techniques for the production of liposomes: a review. *Pharm.Sci.Tech* 9, 798–809.
- Mezzomo, N., Mileo, B.R., Friedrich, M.T., Martínez, J., Ferreira, S.R.S., 2010. Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) almond oil: Process yield and extract composition. *Bioresour. Technol.* 101, 5622–5632.
- Miraliakbari, H., Shahidi, F., 2008. Lipid class compositions, tocopherols and sterols of tree nut oils extracted with different solvents, *J. Food Lipids* 15, 81–96.
- Mitra, P., Ramaswamy, H.S., Chang, K.S., 2009. Pumpkin (*Cucurbita maxima*) seed oil extraction using supercritical carbon dioxide and physicochemical properties of the oil. *J. Food Eng.* 95, 208–213.
- Miura, S., Mutoh, T., Shiinoki, Y., Yoshioka, T., 2006. Emulsifying properties of phospholipids in the reconstitution of cream using butter oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 108, 898–903.

- Mohdaly, A.A., Sarhan, M.A., Smetanska, I., Mahmoud, A., 2010. Antioxidant properties of various solvent extracts of potato peel, sugar beet pulp and sesame cake. *J. Sci. Food Agric.* 90, 218–226.
- Montanari, L., King, J.W., List, G.R., Rennick, K.A., 1996. Selective extraction of phospholipid mixtures by supercritical carbon dioxide and cosolvents. *J. Food Sci.* 61, 1230–1234.
- Montserrat-de la Paz, S., Marín-Aguilar, F., García-Giménez, M.D., Fernández-Arche, M.A., 2014. Hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil: analytical and phytochemical characterization of the unsaponifiable fraction. *J. Agric. Food Chem.* 62, 1105–1110.
- Moré, M.I., Freitas, U., Rutenberg, D., 2014. Positive effects of soy lecithin-derived phosphatidylserine plus phosphatidic acid on memory, cognition, daily functioning, and mood in elderly patients with Alzheimer's disease and dementia. *Adv. Ther.* 31, 1247–1262.
- Morrison, W.R., Smith, L.M., 1964. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride–methanol. *J. Lipid Res.* 5, 600–608.
- Moschidis, M. C., 1985. Phosphonolipides., *Prog. Lipid, Res.* 23, 23–246.
- Moussaoui, N., Cansell, M., Denizot, A., 2002. Marinosomes®, marine lipid-based liposomes: physical characterization and potential application in cosmetics. *Int. J. Pharm.* 242, 361–365.
- Mueller, K., Eisner, P., Yoshie-Stark, Y., Nakada, R., Kirchhoff, E., 2010. Functional properties and chemical composition of fractionated brown and yellow linseed meal (*Linum usitatissimum* L.). *J. Food Eng.* 98, 453–460.
- Mukhamedova, Kh. S., Glushenkova, A. I., 2000. Natural phosphonolipids. *Che. Nat. Comp.* 36. 329–341.
- Nain, S., Oryschak, M.A., Betti, M., Beltranena, E., 2015. *Camelina sativa* cake for broilers: Effects of increasing dietary inclusion from 0 to 24% on tissue fatty acid proportions at 14, 28, and 42 d of age. *Poult. Sci.* 94, 1247–1258.
- Navidghasemizad, S., Temelli, F., Wu, J., 2014. Effect of enzymatic hydrolysis on the extractability of phospholipids from leftover egg yolk using supercritical CO₂. *Sep. Purif. Technol.* 122, 192–198.
- Nieva-Echevarría, B., Goicoechea, E., Manzanos, M.J., Guillén, M.D., 2015. Usefulness of ¹H NMR in assessing the extent of lipid digestion. *Food Chem.* 179, 182–190.
- Oomah, B.D., Busson, M., Godfrey, D.V., Drover, J.C., 2002. Characteristics of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil. *Food Chem.* 76, 33–43.
- Pages, X., 2008. Technologie des corps gras. *Tech. de l'Ing.*, F6070, p.19
- Palacios, L.E., Wang, T., 2005. Extraction of egg-yolk lecithin. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 82, 565–569.
- Pantze, S.F., Parmentier, J., Hofhaus, G., Fricker, G., 2014. Matrix liposomes: a solid liposomal formulation for oral administration. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 116, 1145–1154.
- Pasker, B., Sosada, M., Fras, P., Boryczka, M., Gorecki, M., Zych, M., 2015. Rapeseed phosphatidylcholine hydrolysis to phosphatidic acid using plant extracts with phospholipase D. *Act. Pol. Phar.* 72, 335–340.

- Park, Y.W., Chang, P.-S., Lee, J., 2010. Application of triacylglycerol and fatty acid analyses to discriminate blended sesame oil with soybean oil. *Food Chem.* 123, 377–383.
- Patil, Y.P., Jadhav, S., 2014. Novel methods for liposome preparation. *Chem. Phys. Lipids* 177, 8–18.
- Pazos, A.J., Sánchez, J.L., Román, G., Luz Pérez-Parallé, M., Abad, M., 2003. Seasonal changes in lipid classes and fatty acid composition in the digestive gland of *Pecten maximus*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 134, 367–380.
- Pazos, A.J., Roman, G., Acosta, C.P., Abad, M., Sanchez, J.L., 1997. Seasonal changes in condition and biochemical composition of the scallop *Pecten maximus* L. from suspended culture in the Ria de Arousa (Galicia, N.W. Spain) in relation to environmental conditions. *J. Exp. Marine Biol. Ecol.* 211, 169–193.
- Peet, M., Stokes, C., 2005. Omega-3 fatty acids in the treatment of psychiatric disorders. *Drugs* 65, 1051–1059.
- Pereira, J.A., Oliveira, I., Sousa, A., Ferreira, I.C.F.R., Bento, A., Estevinho, L., 2008. Bioactive properties and chemical composition of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars. *Food Chem. Toxicol.* 46, 2103–2111.
- Pichot, R., Watson, R., Norton, I., 2013. Phospholipids at the interface: current trends and challenges. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 11767–11794.
- Pinsolle, A., Roy, P., Cansell, M., 2014. Modulation of enzymatic PS synthesis by liposome membrane composition. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 115, 157–163.
- Pojić, M., Mišan, A., Sakač, M., Dapčević Hadnađev, T., Šarić, B., Milovanović, I., Hadnađev, M., 2014. Characterization of byproducts originating from hemp oil processing. *J. Agric. Food Chem.* 62, 12436–12442.
- Pulfer, M., Murphy, R.C., 2003. Electrospray mass spectrometry of phospholipids. *Mass. Spectrom. Rev.* 22, 332–364.
- Quezada, N., Cherian, G., 2012. Lipid characterization and antioxidant status of the seeds and meals of *Camelina sativa* and flax. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 114, 974–982.
- Ramachandran, S., Singh, S.K., Larroche, C., Soccol, C.R., Pandey, A., 2007. Oil cakes and their biotechnological applications – A review. *Bioresource Technol.* 98, 2000–2009.
- Rombaut, N., Savoie, R., Thomasset, B., Bélliard, T., Castello, J., Van Hecke, É., Lanoisellé, J.-L., 2014. Grape seed oil extraction: Interest of supercritical fluid extraction and gas-assisted mechanical extraction for enhancing polyphenol co-extraction in oil. *Comptes Rendus Chim.* 17, 284–292.
- Rossi, M., 2007. Use of lecithin and lecithin fractions, in: *Bioactive Egg Compounds*. Springer, pp. 229–239.
- Ruxton, C.H.S., Reed, S.C., Simpson, M.J.A., Millington K.J., 2007. The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. *J. Hum. Nutr. Dietet.* 20, 275–285.

- Saegusa, K., Ishii, F., 2002. Triangular Phase Diagrams in the phospholipid-water-alcohol system for the preparation of lipid vesicles (liposomes) using the coacervation technique. *Lang.* 18, 5984–5988.
- Sahena, F., Zaidul, I.S.M., Jinap, S., Karim, A.A., Abbas, K.A., Norulaini, N.A.N., Omar, A.K.M., 2009. Application of supercritical CO₂ in lipid extraction – A review. *J. Food Eng.* 95, 240–253.
- Salminen, H., Estévez, M., Kivikari, R., Heinonen, M., 2006. Inhibition of protein and lipid oxidation by rapeseed, camelina and soy meal in cooked pork meat patties. *Eur. Food Res. Technol.* 223, 461–468.
- Sánchez-Vicente, Y., Cabañas, A., Renuncio, J.A.R., Pando, C., 2009. Supercritical fluid extraction of peach (*Prunus persica*) seed oil using carbon dioxide and ethanol. *J. Supercrit. Fluids* 49, 167–173.
- Schneider, 2011. Phospholipid processing. 9th Euro Fed Lipid Congress, Rotherdam. 2011.
- Schütz, E., 2007. Supercritical fluids and applications – A patent review. *Chem. Eng. Technol.* 30, 685–688.
- Šegota, S., Težak, D., 2006. Spontaneous formation of vesicles. *Adv. Colloid Interface Sci.* 121, 51–75.
- Shah, A., Akoh, C.C., Toledo, R.T., Corredig, M., 2004. Isolation of a phospholipid fraction from inedible egg. *J. Supercrit. Fluids* 30, 303–313.
- Shim, Y.Y., Gui, B., Wang, Y., Reaney, M.J.T., 2015. Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) oil processing and selected products. *Trends Food Sci. Technol.* 43, 162–177.
- Shukla, V.K.S., Dutta, P.C., Artz, W.E., 2002. Camelina oil and its unusual cholesterol content. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 79, 965–969.
- Singh, H., Thompson, A., 2012. Liposomes as food ingredients and nutraceutical delivery systems. *Encapsulation technologies and delivery systems for Food Ingredients and Nutraceuticals*, 287–318.
- Subra-Paternault, P., ThongDeng, H., Grélard, A., Cansell, M., 2015. Extraction of phospholipids from scallop by-product using supercritical CO₂/alcohol mixtures. *LWT-Food Sci. Technol.* 60, 990–998.
- Suja, K.P., Abraham, J.T., Thamizh, S.N., Jayalekshmy, A., Arumughan, C., 2004. Antioxidant efficacy of sesame cake extract in vegetable oil protection. *Food Chem.* 84, 393–400.
- Suja, K.P., Jayalekshmy, A., Arumughan, C., 2005. Antioxidant activity of sesame cake extract. *Food Chem.* 91, 213–219.
- Szuhaj, B.F., 1983. Lecithin production and utilization. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 60, 306–309.
- Szumacher-Strabel, M., Cieślak, A., Zmora, P., Pers-Kamczyc, E., Bielińska, S., Stanisław, M., Wójtowski, J., 2011. *Camelina sativa* cake improved unsaturated fatty acids in ewe's milk. *J. Sci. Food Agric.* 91, 2031–2037.
- Tanaka, Y., Sakaki, I., Ohkubo, T., 2004. Extraction of phospholipids from salmon Roe with supercritical carbon dioxide and an entrainer. *J. Oleo. Sci.* 53, 417–424.

- Teh, S.-S., Birch, J., 2013. Physicochemical and quality characteristics of cold-pressed hemp, flax and canola seed oils. *J. Food Compos. Anal.* 30, 26–31.
- Temelli, F., 1992. Extraction of triglycerides and phospholipids from canola with supercritical carbon dioxide and ethanol. *J. Food Sci.* 57, 440–443.
- Ternes, W., Jaekel, T., 2010. Analysis of glycerophosphonolipids in egg yolk. *Eur. Food Res. Technol.* 230, 559–570.
- Terpinc, P., Čeh, B., Ulrih, N.P., Abramovič, H., 2012. Studies of the correlation between antioxidant properties and the total phenolic content of different oil cake extracts. *Ind. Crops Prod.* 39, 210–217.
- Testerink, C., Munnik, T., 2011. Molecular, cellular, and physiological responses to phosphatidic acid formation in plants. *J. Exp. Bot.* 62, 2349–2361.
- Thong Deng, H., 2011, Extraction et mise en forme (en liposomes) de phospholipides issus d'un co-produit par voie supercritique. Université Bordeaux. p.213.
- Tomita, K., Machmudah, S., Wahyudiono, Fukuzato, R., Kanda, H., Quitain, A.T., Sasaki, M., Goto, M., 2014. Extraction of rice bran oil by supercritical carbon dioxide and solubility consideration. *Sep. Purif. Technol.* 125, 319–325.
- Touitou, E., Dayan, N., Bergelson, L., Godin, B., Eliaz, M., 2000. Ethosomes—novel vesicular carriers for enhanced delivery: characterization and skin penetration properties. *J. Controlled Release* 65, 403–418.
- Tripathi, M.K., Mishra, A.S., 2007. Glucosinolates in animal nutrition: A review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 132, 1–27.
- Vakhapova, V., Richter, Y., Cohen, T., Herzog, Y., Korczyn, A.D., 2011. Safety of phosphatidylserine containing omega-3 fatty acids in non-demented elderly: a double-blind placebo-controlled trial followed by an open-label extension. *BMC Neurol.* 11, 79–89.
- Van Den Bergh, B.A.I., Salomons-de Vries, I., Bouwstra, J.A., 1998. Interactions between liposomes and human *stratum corneum* studied by freeze-substitution electron microscopy. *Intern. J. Pharm.* 167, 57–67.
- Van Nieuwenhuyzen, W., 2014. The changing world of lecithins. *INFORM.* 25, 193–272.
- Van Nieuwenhuyzen, W., Tomás, M.C., 2008. Update on vegetable lecithin and phospholipid technologies. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 110, 472–486.
- Van Smeden, J., Janssens, M., Gooris, G.S., Bouwstra, J.A., 2014. The important role of *stratum corneum* lipids for the cutaneous. *Biochim. Et Biophys. Acta* 1841, 295–313.
- Venkatachalam, M., Sathe, S.K., 2006. Chemical composition of selected edible nut seeds. *J. Agric. Food Chem.* 54, 4705–4714.

- Vierl, U., Löbbecke, L., Nagel, N., Cevc, G., 1994. Solute effects on the colloidal and phase behavior of lipid bilayer membranes: ethanol-dipalmitoylphosphatidylcholine mixtures. *Biophys. J.* 67, 1067-1079.
- Vonapartis, E., Aubin, M.-P., Seguin, P., Mustafa, A.F., Charron, J.-B., 2015. Seed composition of ten industrial hemp cultivars approved for production in Canada. *J. Food Compos. Anal.* 39, 8–12.
- Wagner, A., Vorauer-Uhl, K., 2011. Liposome technology for industrial purposes. *J. Drug Deliv.* 2011, 1–9.
- Walde, P., Ichikawa, S., 2001. Enzymes inside lipid vesicles: preparation, reactivity and applications. *Biomol. Eng.* 18, 143–177.
- Welti, R., 2002. Profiling membrane lipids in plant stress responses. Role of phospholipase D α in freezing-induced lipid changes in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 277, 31994–32002.
- Wilkinson, N., Hilton, R., Hendry, D., Venkitasamy, C., Jacoby, W., 2014. Study of process variables in supercritical carbon dioxide extraction of soybeans. *Food Sci. Technol. Int.* 20, 63–70.
- Wojcicki, J., Pawlik, A., Samochowiec, L., Kalsońska, M., Myśliwiec, Z., 1995. Clinical evaluation of lecithin as a lipid-lowering agent. *Phytother. Res.* 9, 597–599.
- Wolff, R., Combe, N., Entressangles, B., 1985. Cardiolipides : Purification et hydrolyse enzymatique rapide par la phospholipase A2, *Rev. Fr. Corps Gras.* 32, 251–255.
- Yang, J., Liu, H., Zhang, X., 2014. Design, preparation and application of nucleic acid delivery carriers. *Biotechnol. Adv.* 32, 804–817.
- Zaidul, I.S.M., Nik Norulaini, N.A., Mohd Omar, A.K., Smith, R.L., 2007. Supercritical carbon dioxide (SC-CO₂) extraction of palm kernel oil from palm kernel. *J. Food Eng.* 79, 1007–1014.
- Zhao, S., Zhang, D., 2014. An experimental investigation into the solubility of *Moringa oleifera* oil in supercritical carbon dioxide. *J. Food Eng.* 138, 1–10.
- Zubr, J., 1997. Oil-seed crop: *Camelina sativa*. *Ind. Crops Prod.* 6, 113–119.
- Zubr, J., 2003. Dietary fatty acids and amino acids of *Camelina sativa* seed. *J. Food Qual.* 26, 451–462.

Annexes

Nouvelles caractéristiques de l'extraction des phospholipides dans un réacteur tubulaire de 490 mL à P = 25 MPa et T = 45°C :

Une masse de charge équivalente à celle introduite dans le réacteur de 100 mL est introduite dans le réacteur de 490 mL. L'hypothèse de travail est que pour une même quantité de matière chargée et de solvants passés, la masse extraite est équivalente, et cela quel que soit le volume du réacteur.

Dans un premier temps, le débit de CO₂ et ainsi celui de l'éthanol ont été calculés pour garder un écoulement de fluide semblable entre les deux systèmes. L'écoulement se caractérise par un nombre adimensionnel appelé nombre de Reynolds. Il est calculé de la façon suivante :

$$Re = \frac{\rho v D}{\mu}$$

Avec ρ = masse volumique du fluide (kg.m⁻³)

v : vitesse du fluide (m.s⁻¹)

D : diamètre du réacteur (m)

μ : viscosité du fluide (Pa.s)

L'indice (1) correspond au solvant à 7% d'éthanol, l'indice (2) au solvant à 27% d'éthanol et enfin, l'indice « ' » au réacteur de 490 mL. Sans l'indice « ' », les données correspondent au réacteur de 100 mL.

Appellations :

Débit massique de CO₂ : $Dm_{CO_2} = 1,08.10^{-1} \text{ g.s}^{-1}$

Masse volumique du CO₂ : $\rho_{CO_2} = 857.10^3 \text{ g.m}^{-3}$

Viscosité du CO₂ : $\mu_{CO_2} = 8,19.10^{-5} \text{ Pa.s (kg.m}^{-1}.\text{s}^{-1})$

(L.B. Ouyang, 2011. *The open petroleum engineering journal* 4, 13-21)

Masse volumique EtOH liquide : $\rho_{EtOH} = 785.10^3 \text{ g.m}^{-3}$

Débit volumique EtOH (1) : $DV_{EtOH} = 1.10^{-8} \text{ m}^3.\text{s}^{-1}$

Débit volumique EtOH (2) : $DV_{EtOH} = 5,17.10^{-8} \text{ m}^3.\text{s}^{-1}$

Viscosité de l'EtOH : $\mu_{EtOH} = 6,93.10^{-4} \text{ Pa.s}$

(Techniques de l'Ingénieur K492, 1994. *Int. J. of thermophysics* 15, 189-201)

DV_{tot} : Débit volumique total de solvant (m³.s⁻¹)

v_{fl} : Vitesse du fluide/solvant (m.s⁻¹)

Re : Nombre de Reynolds

S : Section de passage du réacteur (m²)

D : Diamètre du réacteur (m)

μ : Viscosité du fluide ou du solvant (Pa.s)

x : Fraction massique

Dm_{EtOH} : Débit massique EtOH (g.min⁻¹)

Dm_{tot} : Débit massique total (g.min⁻¹)

t : Temps de collecte (min)

⇒ **Calcul du nombre de Reynolds dans le réacteur de 100 mL :**

1.1. Vitesse du solvant dans le réacteur :

En prenant en compte les huit extractions réalisées sur le réacteur de 100 mL, le débit volumique moyen est :

$$Dv_{CO_2} = 1,1.10^{-7} \text{ m}^3.s^{-1}$$

$$Dv_{EtOH (1)} = 1,0.10^{-8} \text{ m}^3.s^{-1}$$

$$Dv_{EtOH (2)} = 5,3.10^{-8} \text{ m}^3.s^{-1}$$

Ainsi, $Dv_{tot} = Dv_{EtOH (1)} + Dv_{CO_2}$ où $Dv_{CO_2} = \frac{Dm_{CO_2}}{\rho_{CO_2}}$

$$Dv_{tot} = 1,0.10^{-8} + 1,1.10^{-7}$$

$$Dv_{tot} = 1,2.10^{-7} \text{ m}^3.s^{-1}$$

Soit une vitesse de :

$$v_{fil}(1) = \frac{Dv_{tot} (1)}{S}$$

$$v_{fil}(1) = \frac{1,4.10^{-7}}{\pi \times (1,5.10^{-2})^2}$$

$$v_{fil} (1) = 1,7.10^{-4} \text{ m.s}^{-1}$$

1.2 Masse volumique et viscosité du solvant CO₂ - 7% d'EtOH :

$$\rho (1) = x_{CO_2} \times \rho_{CO_2} + x_{EtOH} \times \rho_{EtOH}$$

$$\rho (1) = 0,93 \times 857.10^3 + 0,07 \times 785.10^3$$

$$\rho (1) = 851,96.10^3 \text{ g.m}^{-3}$$

$$\mu (1) = x_{CO_2} \times \mu_{CO_2} + x_{EtOH} \times \mu_{EtOH}$$

$$\mu (1) = 0,93 \times 8,19.10^{-5} + 0,07 \times 6,93.10^{-4}$$

$$\mu (1) = 1,25.10^{-4} \text{ Pa.s}$$

1.3 Nombre de Reynolds dans le réacteur de 100 mL :

$$Re(1) = \frac{\rho(1) \times v_{fl}(1) \times D}{\mu(1)}$$

$$Re(1) = \frac{851,96 \times 1,7 \cdot 10^{-4} \times 3 \cdot 10^{-2}}{1,25 \cdot 10^{-4}}$$

$$Re(1) = 35,8$$

En appliquant les mêmes calculs pour l'étape en CO₂ - 27% d'EtOH, le nombre de Reynolds vaut :

$$Re(2) = 24,0$$

Dans les deux cas, un régime laminaire proche de l'écoulement piston est établi.

2. Calcul du débit de CO₂ dans le réacteur de 490 mL :

Afin de garder un écoulement similaire entre les deux réacteurs, le nombre de Reynolds doit rester égal entre les deux réacteurs. Pour cela la vitesse du fluide, soit le débit doit être adapté à la nouvelle section du réacteur.

2.1 Vitesse du fluide dans le réacteur de 490 mL pour 7% EtOH :

$$Re(1) = Re(1)' = 35,8$$

$$Re(1)' = \frac{\rho(1) \times v_{fl}(1)' \times D'}{\mu(1)}$$

Soit,

$$v_{fl}(1)' = \frac{Re(1)' \times \mu(1)}{\rho(1) \times D'}$$

$$v_{fl}(1)' = \frac{35,8 \times 1,25 \cdot 10^{-4}}{851,96 \times 5 \cdot 10^{-2}}$$

$$v_{fl}(1)' = 1,05 \cdot 10^{-4} \text{ m.s}^{-1}$$

2.2 Calcul du débit volumique total du fluide pour 7% d'EtOH :

$$Dv_{tot}(1)' = v_{fl}(1)' \times S'$$

$$Dv_{tot}(1)' = 1,05 \cdot 10^{-4} \times \pi \times (2,5 \cdot 10^{-2})^2$$

$$Dv_{tot}(1)' = 2,06 \cdot 10^{-7} \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$$

2.3 Calcul du débit massique du CO₂ pour le réacteur de 500 mL :

$$Dv_{tot}(1)' = Dv_{EtOH}(1)' + Dv_{CO_2}'$$

$$Dv_{tot}(1)' = \frac{Dm_{EtOH}(1)'}{\rho_{EtOH}} + \frac{Dm_{CO_2}'}{\rho_{CO_2}}$$

Or le fluide contient 7% d'éthanol, donc :

$$Dm_{EtOH} = 0,07 \times Dm_{tot}$$

$$Dm_{EtOH} (1)' = 0,07 \times (Dm_{EtOH} + Dm_{CO2})$$

$$Dm_{EtOH} (1)' = \frac{0,07 Dm_{CO2}}{0,93}$$

$$Dvtot (1)' = \frac{0,07 \times Dm_{CO2}'}{0,93 \times \rho_{EtOH}} + \frac{Dm_{CO2}'}{\rho_{CO2}}$$

$$Dvtot (1)' = Dm_{CO2}' \left[\frac{0,07}{0,93 \times \rho_{EtOH}} + \frac{1}{\rho_{CO2}} \right]$$

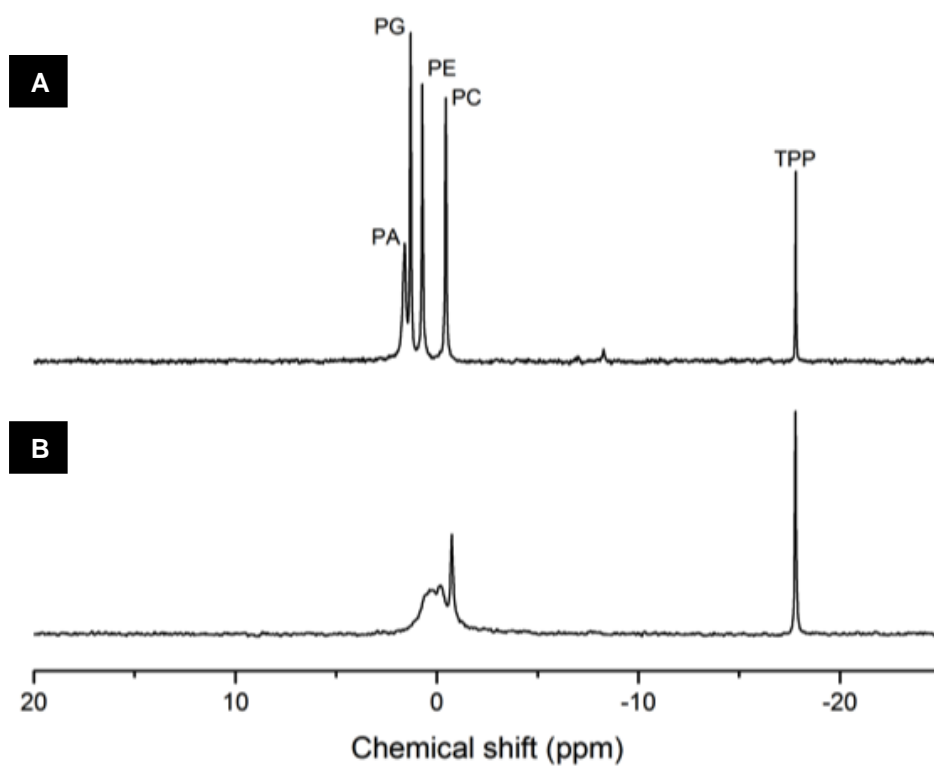
$$Dm_{CO2}' = Dvtot (1)' \frac{0,93 \times \rho_{EtOH} \times \rho_{CO2}}{0,93 \rho_{EtOH} + 0,07 \rho_{CO2}}$$

$$Dm_{CO2}' = 2,06 \cdot 10^{-7} \frac{0,93 \times 785 \cdot 10^3 \times 857 \cdot 10^3}{0,93 \times 785 \cdot 10^3 + 0,07 \times 857 \cdot 10^3}$$

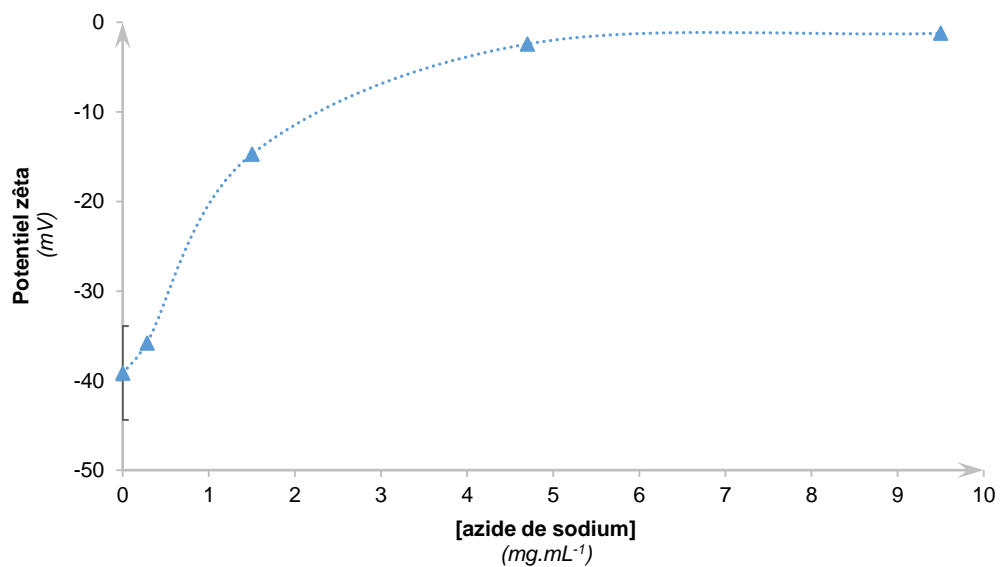
$$Dm_{CO2} (1)' = 1,63 \cdot 10^{-1} \text{ g.s}^{-1}$$

Soit $Dm_{CO2} (1)' = 9,8 \text{ g.min}^{-1}$

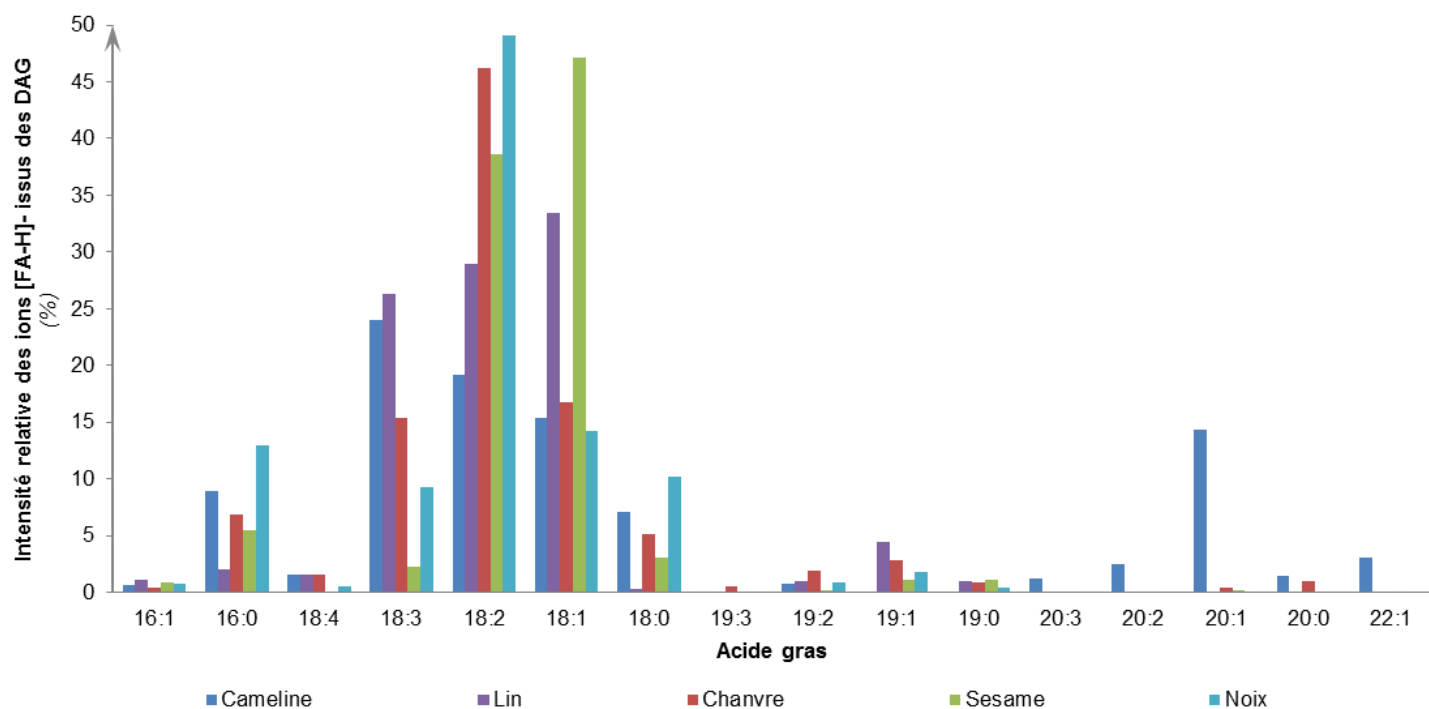
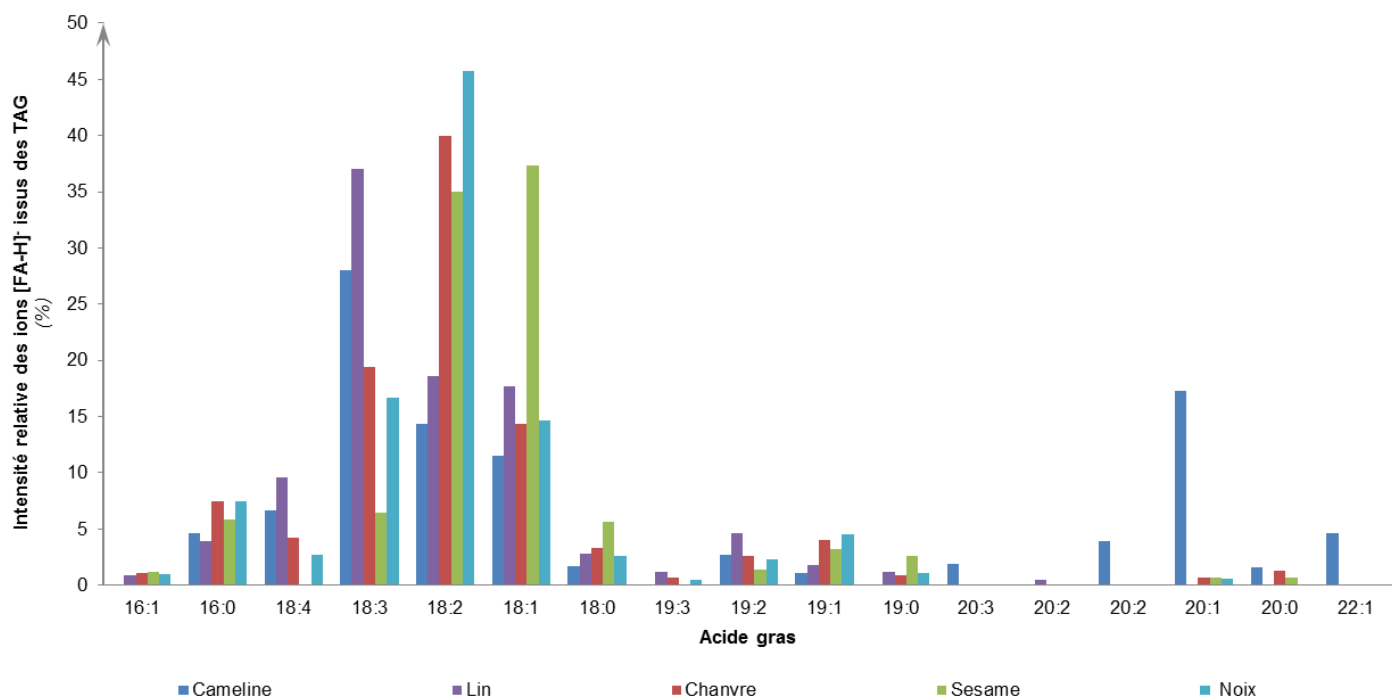
Classes des PL présents dans les LT extraits du tourteau de cameline (Bioplanète) obtenus par spectres RMN ^{31}P avec la présence d'EDTA (A) ou l'absence d'EDTA (B).

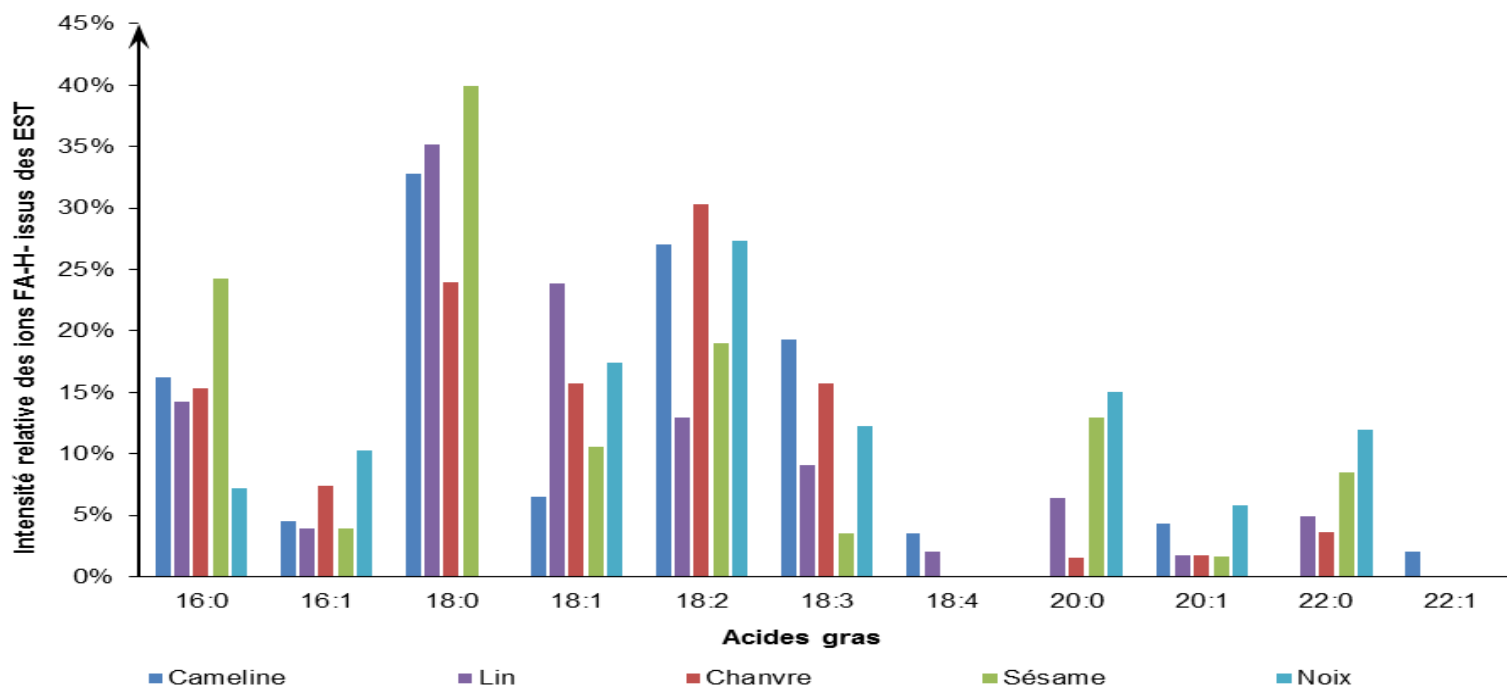
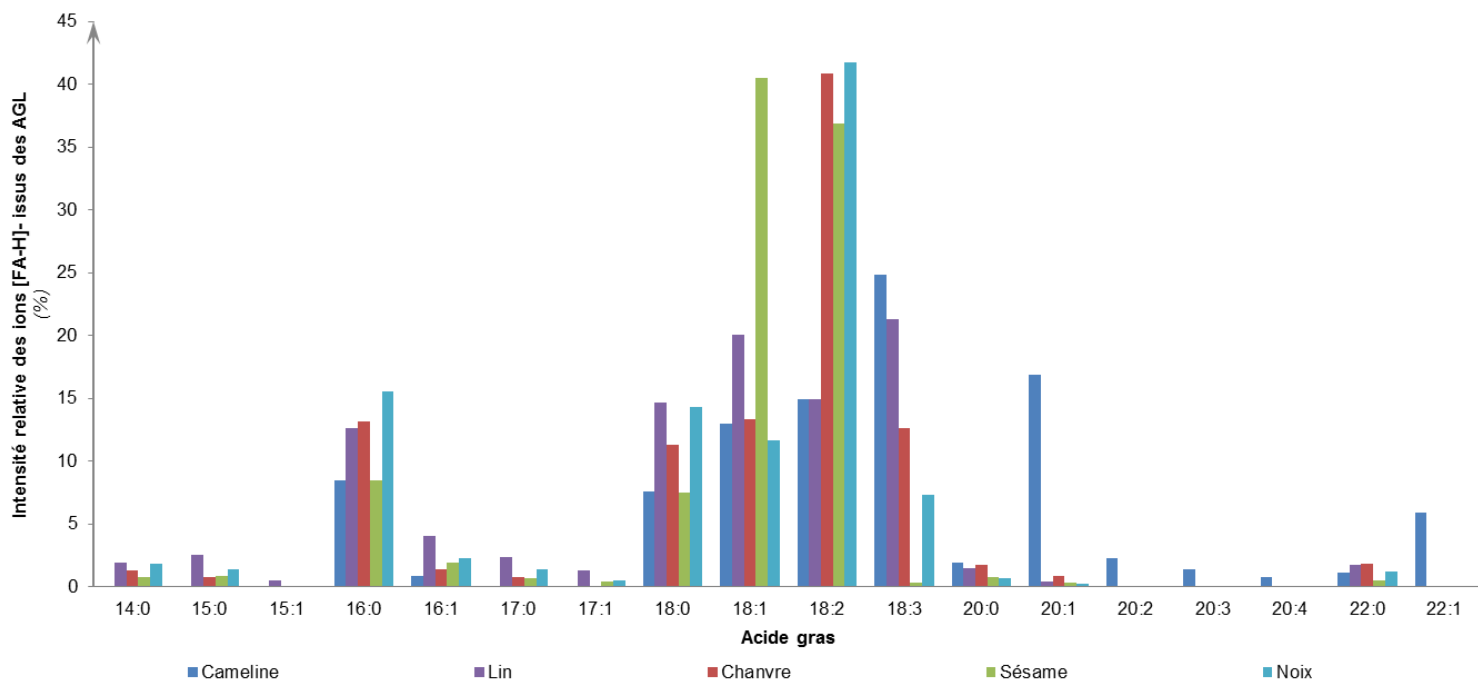


Effet de l'azide de sodium sur le potentiel zêta des liposomes ($[Lécithine]_{finale} = 1 \text{ mg.mL}^{-1}$).



Composition en acides gras des TAG, DAG, AGL et EST déterminée par LC-MS.





12TH EURO FED LIPIDS CONGRESS: OILS, FATS AND LIPIDS:
 FROM LIPIDOMICS TO INDUSTRIAL INNOVATION

Recovery of oils from press cakes by CO₂-based technology

Tiphaine Bardeau^{1,2,3}, Raphaëlle Savoie^{1,2,3,*}, Maud Cansell^{1,2,3} and Pascale Subra-Paternault^{1,2,3}

¹ Université de Bordeaux, CBMN, UMR 5248, 33600 Pessac, France

² CNRS, CBMN, UMR 5248, 33600 Pessac, France

³ Bordeaux INP, CBMN, UMR 5248, 33600 Pessac, France

Received 7 January 2015 – Accepted 22 January 2015

Abstract – In a context of a strong demand for vegetable oils, the development of new “green” processes is essential to provide methods that avoid the use of organic solvents, work at relatively low temperatures and preserve the quality of the final products. The supercritical fluid extraction (SFE) process meets these objectives. In this study, five meals (hemp, flax, sesame, poppy and walnut) were subjected to SFE at 45 °C and 250 bar in the presence of ethanol as co-solvent. Using this method, between 77 and 98% of the lipids present in the meal could be extracted. Except for poppy, 50% of the lipids present in the cake were recovered as a separate oily liquid phase. SFE was not selective toward certain types of triglycerides: the oils obtained exhibited the same fatty acid profile than the total lipid extracts from the cakes. In contrast, the composition in minor lipid components was dependent on the type of meal investigated. For example, hemp lipid extract was particularly rich in chlorophyll.

Keywords: Supercritical fluid extraction / press cake / oil recovery / oil quality

Résumé – Technologie à base de CO₂ pour l'extraction d'huiles de tourteaux de pressage. Dans un contexte de forte demande en huiles végétales, le développement de nouveaux procédés « verts » est indispensable pour proposer des procédés évitant l'utilisation de solvants organiques, travaillant à relativement basse températures et préservant les qualités nutritionnelles et organoleptiques des produits finaux. Le procédé d'extraction par fluide supercritique (EPS) répond à ces objectifs. Dans cette étude, cinq tourteaux végétaux (chanvre, lin, sésame, pavot et noix) ont été soumis au procédé d'EPS à 45 °C et 250 bar en présence d'éthanol comme co-solvant. Ce procédé a permis d'extraire entre 77 et 98% des lipides présents dans les tourteaux. À l'exception du pavot, 50% des lipides présents dans les tourteaux se retrouvent sous la forme d'une phase liquide huileuse indépendante. L'EPS n'est pas sélective vis-à-vis de triglycérides particuliers. En effet, l'huile extraite a le même profil en acides gras que les lipides totaux du tourteau. Néanmoins, selon la nature du tourteau considéré, la composition en composés lipidiques mineurs est très variable. Par exemple, la quantité de chlorophylle extraite est très importante dans le cas du tourteau de chanvre.

Mots clés : Extraction par fluide supercritique / tourteau de pressage / extraction d'huile / qualité de l'huile

1 Introduction

Oil demand is in constant increase for years due to nutritional and industrial issues. For nutritional aspects, recommendations concerning the omega 3/omega 6 balance are responsible for new developments in specialty oils and for a global increase of the oil volume demand. In the same time, the use of oil for biodiesel production is also increasing. By still containing 10 to 30% of oil, press cakes are valuable sources of oils that, by regards of environmental and human health concerns, could be recovered by eco-efficient processes. So far, large scale oil facilities process is based on a pressing step followed by a solvent extraction using hexane to exhaust the cake

(Fine, 2013). As an alternative and eco-efficient approach, supercritical fluid extraction (SFE) can be envisaged.

The recovery of oil from oilseeds by SFE is a solid-fluid extraction process that uses mostly carbon dioxide as extracting fluid. Indeed, oil solubility in supercritical carbon dioxide (scCO₂) is relatively high (0.1 to 200 g oil/kg CO₂) depending on the fluid density (*i.e.* pressure and temperature) (del Valle *et al.*, 2012). ScCO₂ is an apolar fluid so ethanol is often used as a cosolvent to modify its polarity and to favor co-extraction of more polar compounds. SFE of oilseeds has been extensively studied on various matrices over the past decades (Eggers, 1996). However, SFE applied on press cakes is more confidential and the consequences of pressing on SFE performances still have to be evaluated.

* Correspondence: raphaëlle.savoie@enscbp.fr

Table 1. Press cake compositions (different letters are for statistically different lipid content (Tukey HSD test at 95% confidence interval)).

| | Hemp | Linseed | Poppy | Sesame | Walnut |
|-----------------------|--|---|---|--|---|
| Water content* (% db) | 7.3 (≤ 12) | 8 \pm 1 (≤ 12) | 9.2 (≤ 12) | 7.6 (≤ 10) | 5.4 (≤ 10) |
| Lipid content* (%db) | 11 \pm 2 ^c (≤ 12) | 11 \pm 1 ^{ac} (≤ 12) | 12 \pm 1 ^{ac} (≤ 12) | 23 \pm 2 ^b (≤ 25) | 8 \pm 1 ^a (≤ 45) |
| Ash (%)** | ≤ 15 | ≤ 10 | ≤ 15 | ≤ 10 | ≤ 10 |
| Proteins (%wb)** | 25–40 | 15–45 | 30–45 | 30–50 | 20–40 |
| Cellulose (%wb)** | 20–35 | ≤ 10 | 5–15 | ≤ 10 | ≤ 10 |

* Values in parentheses are from supplier's datasheet. ** Values are from supplier's datasheet.

In this work, SFE was investigated as a technique to recover residual edible oils from various press cakes presenting different fatty acid profiles. Hempseed oil is a linoleic oil, typically composed of 56% of linoleic acid (18:2 n-6), 22% of α -linolenic acid (18:3 n-3), and 9% of oleic acid (18:1) (Callaway, 2004). Walnut oil can be classified in the same category with 56–65% of 18:2, 14–21% of 18:1, 9–15% of 18:3 and 6–8% of palmitic acid (16:0) (Morin, 1996a). Poppy seed oil is also a linoleic oil with 69–77% of 18:2, 13–18% of 18:1, 9–11% of 16:0 and less than 3.5% of other fatty acids (Morin, 1996b). Linseed oil (also call flaxseed oil) is a linolenic oil and is typically composed of 59% of 18:3, 15% of 18:2, 18% of 18:1 other fatty acids accounting for less than 10% of the total fatty acids (Przybylski, 2005). Sesame oil is an oleic-linoleic oil containing 39–47% of 18:2, 37–42% of 18:1, 8–11% of 16:0 and 4–6% of stearic acid (18:0) (Morin, 1996b). These seeds present different fatty acid profiles but have in common a high degree of unsaturation.

Supercritical extraction has already been investigated for these five seeds and nut, and the studies generally focused on the effect of process parameters (namely pressure, temperature and flow rate) on extraction yield (on sesame (Corso et al., 2010; Döker et al., 2010); on hemp (Da Porto et al., 2012a, 2012b); on poppy (Bozan and Temelli, 2003); on walnut (Oliveira et al., 2002; Salgin and Salgin, 2006)). For instance, on linseed, SFE optimization (Bozan and Temelli, 2002; Ivanov, 2012; Jiao, 2008; Özkal, 2009; Rombaut, 2013) showed that an increase of temperature and pressure increased the oil yield. Depending on extraction conditions, up to 82% of oil could be extracted with neat CO₂. In Ivanov's work (2012), ethanol was used as cosolvent, but it was directly added to the load prior to CO₂ extraction. The higher the quantity of ethanol, the higher was the oil yield (up to 99%). Whilst SFE is mainly investigated on raw seeds, SFE on press cake is more rarely reported. Dealing with walnut press cake, Martinez et al. (2008) recovered the oil with yield higher than 90% for SFE carried out at 40 MPa and temperatures higher than 50 °C.

The oil quality is generally assessed by calorimetry, peroxide value (for oxidative status characterization) or absorbance at specific wavelengths (for minor compound determination). Whatever the seeds, the oil recovered by supercritical technology was generally of a lower quality than cold pressed oils. For example, Martinez et al. (2008) first pressed walnuts and then performed SFE on the press cake. The two oils produced were analyzed by same methods. SFE oils presented higher acid value (0.4% oleic acid vs. 0.1% for cold press oils) and lower oxidative stability (0.3 to 0.8 h vs. 3 h for cold press

oils; measured with the Rancimat method). So SFE oils were more degraded and less stable than cold pressing oils. However, SFE oils contained higher amounts of carotenoids (9 μ g/g of oil vs. 2 μ g/g for cold press oil).

The aim of this study was to evaluate SFE performance at recovering residual oil when applied to five press cakes that exhibited different lipid contents and matrix characteristics. The process efficiency was evaluated in terms of oil yield and oil characteristics.

2 Materials and methods

2.1 Raw material

Press cakes were supplied by Bioplanète (Bram, France). Cakes came from organic seeds of poppy (*Papaver somniferum* L. var. nigrum), linseed (*Linum usitatissimum* L.), hemp (*Cannabis sativa* L.) and sesame (*Sesamum indicum*). Walnut (*Juglans regia*) cake was also used. The characteristics of cakes are given in Table 1.

Total lipid content was determined by chloroform/methanol extraction according to Folch method (Folch, 1957). Water content was assessed using a thermobalance (Sartorius) at 105 °C until mass variation became lower than 1 mg. Other characteristics were given by the supplier.

2.2 Supercritical fluid extraction

The scheme of the set-up is provided in Figure 1. The equipment is mainly composed of a 0.49 L cylindrical vessel fed by two high pressure pumps (Gilson). Liquid CO₂ (Air Liquide, France) was first cooled to -0.3 °C before the pump then heated to 45 °C by an electrical heater before being introduced in the vessel. The vessel that contained the matrix was thermally controlled by an electrical mantle.

Supercritical fluid extraction was carried out at 45 °C and 25 MPa using CO₂ (~15 g min⁻¹) and ethanol (~7 %wt) as cosolvent. The vessel was first loaded with 35 g of milled press cake then heated to 45 °C. Pure CO₂ was introduced until a pressure of 25 MPa and the vessel was isolated at this pressure for 35 min. The two pumps were then activated and the CO₂ + 7% wt ethanol mixture flew through the matrix bed. Extracts were collected at atmospheric pressure after the fluid depressurization. The first two fractions, called F0 and F1, were

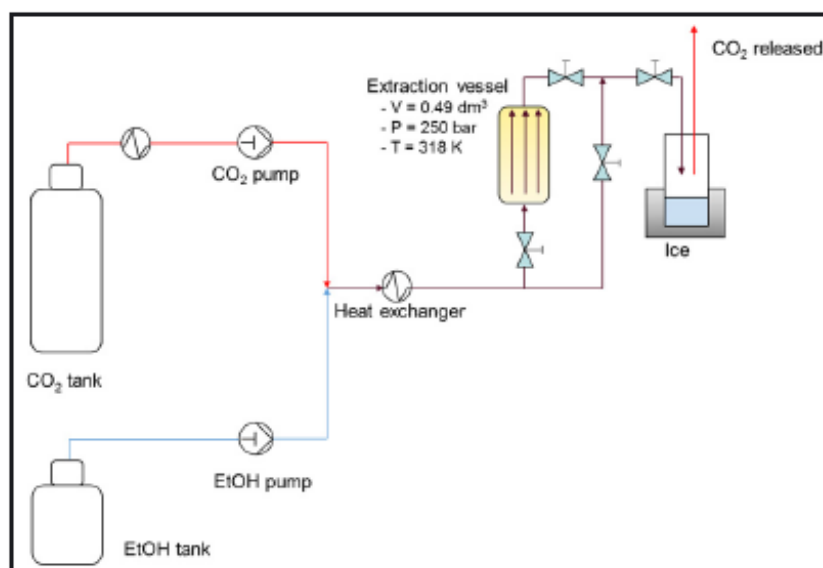


Fig. 1. Experimental SFE setup.

each collected after 60 min of flow. After these 120 min, extraction was continued with 27% wt ethanol to exhaust the cake in more polar lipids. At the end, pure CO₂ flew over the matrix bed for one hour to remove ethanol. In this work we focused on the oily phase, so only the F0 fraction was characterized.

2.3 Extract characterization

Collected extracts were centrifuged for phase separation. Each phase was then weighted and its volume measured. Ethanol was evaporated under a flux of nitrogen for mass balance assessment. The lipid content of the extracted matrix (hereafter called residue) was determined by the Folch method as well (Folch, 1957).

Extraction yield was calculated as the global extracted mass divided by press cake amount introduced in the SFE vessel. Lipid extraction yield was expressed as the ratio of the mass of total lipid extracted (calculated by difference between press cake lipid content and residue lipid content) to the lipid mass in the press cake. Oil yield was calculated as the ratio of free oil recovered from the oily phase to the total lipid mass of press cake.

Fatty acid profiles were determined by gas chromatography (GC) analysis after transesterification. Total lipid fractions were transmethylated in presence of boron trifluoride-methanol complex (Morisson, 1964). Fatty acid methyl esters were separated on a BPX 70 capillary column (60 m long, 0.25 µm film, 0.25 mm i.d., SGE (Melbourne, Australia)), using hydrogen as carrier gas and a split ratio between 1:50 and 1:60. The GC system consisted in a gas chromatograph (GC 2010 plus, Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with a flame ionization detector maintained at 280 °C. The injector was at 250 °C. The column temperature was programmed from 150 °C to 200 °C (1.3 °C/min) held for 30 min, then from 200 °C to 250 °C (20 °C/min) held for 30 min. Data

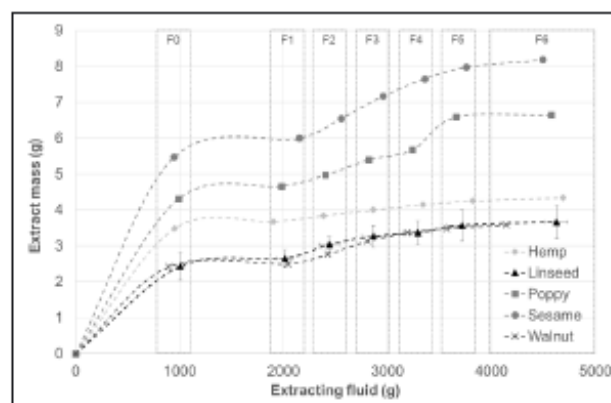


Fig. 2. Extraction kinetic.

was collected and integrated by a GC solution v2.4 integration system (Shimadzu). Fatty acids from Sigma were used as standards for calibration.

Absorbance and spectra (300–900 nm) of oily phases were recorded on Hitachi U2800 spectrometer after dilution with hexane and using quartz cells. The carotenoid content was determined as β-carotene equivalent from absorbance at 453 nm using β-carotene diluted in groundnut oil for calibration (0–5 mg/kg) (Lichtenthaler, 2001).

Oxidative status of the oily phases was assessed by peroxide value determination (ISO3960 adapted method).

3 Results and discussion

3.1 Extraction kinetic

The overall extraction kinetic of the five cakes is given in Figure 2. The first part of the curve, up to 2 kg of fluid, corresponded to F0 and F1 fractions recovered using CO₂ + 7%

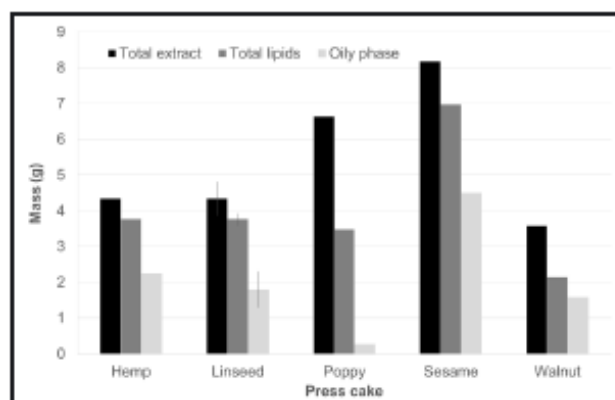


Fig. 3. Extracted masses.

ethanol. Most of the extracted amount came from F0 since F1 contributed only for few milligrams. This F0 fraction represented 65 to 67% of the total extract for all press cakes except hemp for which it represented 80%. The extraction kinetics exhibited then a second increase after 2 kg of fluid that corresponded to the increase of ethanol to 27 %wt. This higher content of ethanol allowed for extracting more polar lipids like for instance phospholipids and ensured thus that the extraction is effective for all classes of lipids (Catchpole *et al.*, 2009).

3.2 Extraction efficiency

The total extracted mass was highly dependent on the raw material nature and varied from 3.6 g for walnut to 8.2 g for sesame (Fig. 3). The mass could be correlated to the initial lipid content of the press cake (Tab. 1). As observed when comparing sesame and walnut, the higher the lipid content, the higher was the extracted mass. Hemp, linseed and walnut, that are similar in terms of lipid contents (8 to 11%), resulted in intermediate and similar extracted amounts. Only poppy showed a different behavior with an extracted mass fifty percent higher than hemp despite similar lipid content. For the five press cakes, the extracted material was mainly composed of lipids, in a content that varied from 50 to 97%. Hemp, linseed and sesame extracts contained more than 85% of lipids whereas extracts were composed of 52 and 60% of lipids for poppy and walnut, respectively.

Walnut exhibited a different behavior that could be due to a different cell structure owing to the matrix nature (walnut is not an oleaginous seed but a nut) (Morin, 1996b). Poppy's behavior was also quite surprising but its particular behavior could not be related to a particular chemical composition of the oil or the structure of the seed.

Excepted for poppy, all F0 fractions were biphasic with an oily phase at bottom and an ethanolic supernatant on top of it. The biphasic nature of F0 could be explained by the low solubility of vegetable oil in ethanol at ambient temperature (Johnson and Lusas, 1983). Supercritical CO₂ is a very good solvent of triglycerides (Sahena *et al.*, 2009) so neutral lipids were indeed extracted. But, after decompression, when the fluid mixture splits in gaseous CO₂ and liquid ethanol, the collected volume of ethanol was not high enough to dissolve

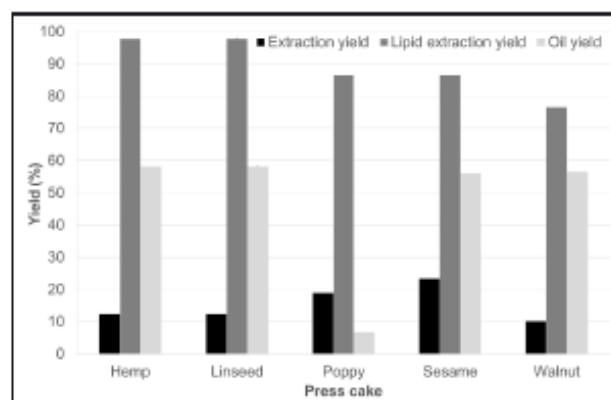


Fig. 4. Extraction yields.

the oil so a biphasic extract was recovered. With again exception of poppy, more than half of the extracted lipids were recovered as a separate oily phase. The mass of this oil was highly dependent of the raw material and was well correlated to the press cake initial lipid content. For poppy, only 7% of extracted lipids were in a separate phase that was, moreover, solid at ambient temperature.

The efficiency of an extraction process is classically evaluated by yields. Here, three yields have been defined corresponding to the three levels of extract characteristics. The global extraction yield is the total extracted mass divided by the press cake amount; the lipid extraction yield is the mass of extracted lipids divided by the mass of lipids in the loaded press cake whereas the oil yield only considers the oily phase divided by the initial amount of lipids in the loaded press cake.

The global extraction yields were comprised between 10 and 23% (Fig. 4), the highest values being for sesame and poppy (23 and 19%, respectively) and the lowest for walnut (10%). The lipid extraction yield indicates the performance of the technique to remove the initial amounts of lipids in cakes. Lipid extraction yields were relatively high varying from 87 to 98% for hemp and walnut, respectively. Linseed, poppy and sesame exhibited lipid yield in the range of 87–92%. These yields were higher than the majority of those reported for lipid extraction by neat CO₂ from same seeds (Bozan and Temelli, 2002, 2003; Corso *et al.*, 2010; Da Porto *et al.*, 2012a, 2012b). However, on walnut press cake, Martinez *et al.* (2008) obtained an oil yield of 92% that is higher than the 76% obtained herein.

Regarding specifically the oil phase, yields were in the same range for hemp, sesame and walnut press cakes (~56%) and in lesser extend for linseed (45%), but it was far smaller for poppy (7%). As already mentioned, the F0 poppy fraction was really different from the other F0 since lipids did not form a separate oily phase.

3.3 Composition of F0 fraction

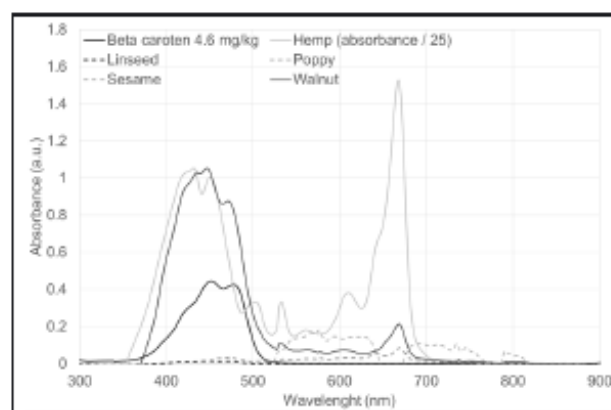
F0 fractions were characterized in terms of fatty acid profile and peroxide values for the oily phase, whereas the carotenoids were quantified on both the oily and the ethanol phases. Results of characterization are overviewed in Table 2.

Table 2. Fatty acid profiles, and minor compounds composition.

| | | Hemp | | Linseed | | Poppy | | Sesame | | Walnut | |
|--|--------|---------------|-------------------|---------------|-------------------|---------------|-------------------|---------------|-------------------|---------------|-------------------|
| | | Press cake | SFE F0 oily phase | Press cake | SFE F0 oily phase | Press cake | SFE F0 oily phase | Press cake | SFE F0 oily phase | Press cake | SFE F0 oily phase |
| Fatty acids (%) | 16:0 | 8.2 | 7.1 | 7.1 | 6.4 | 10.2 | 9.7 | 8.3 | 8.4 | 8.2 | 6.8 |
| | 18:0 | 3.4 | 2.8 | 3.6 | 3.4 | 2.2 | 2.2 | 5.8 | 6.3 | 3.1 | 2.5 |
| | 18:1 | 15.1 | 15.8 | 18.7 | 18.7 | 13.9 | 14.3 | 38.6 | 41.4 | 15.7 | 16.1 |
| | 18:2 | 55.4 | 56.9 | 22.1 | 20.9 | 72.6 | 72.7 | 44.5 | 41.8 | 61.0 | 62.5 |
| | 18:3 | 14.9 | 14.2 | 46.8 | 49.2 | 0.6 | 0.6 | 0.4 | 0 | 10.3 | 11.6 |
| | Others | 3.0 | 3.3 | 1.6 | 1.4 | 0.4 | 0.5 | 2.5 | 2.1 | 1.7 | 0.6 |
| | | Oily phase | | Oily phase | | Oily phase | | Oily phase | | Oily phase | |
| Carotenoids (mg eq. β -caroten/kg oil) | | 231 | | 22 | | 0 | | 0 | | 9 | |
| Chlorophyll | | Presence | | Absence | | Absence | | Presence | | Presence | |
| Peroxide value (meq. O_2 /kg oil) | | >15 | | <15 | | n.d. | | >15 | | <15 | |
| | | Ethanol phase | | Ethanol phase | | Ethanol phase | | Ethanol phase | | Ethanol phase | |
| Carotenoids (mg eq. β -caroten/kg dry extract) | | 1810 | | 45 | | 3 | | 1 | | 12 | |
| Chlorophyll | | Presence | | Absence | | Absence | | Absence | | Absence | |

Regarding the fatty acid profile, the oils obtained by SFE have almost the same fatty acid composition than the raw materials. This absence of selectivity of SFE towards specific triglycerides as measured by the fatty acid composition was also observed in literature on various raw materials (Da Porto *et al.*, 2012a; Martinez *et al.*, 2008). Peroxide value determination was performed on all F0 oily fractions except for poppy whose oily fraction was solid and of too low volume to allow measurements. The oil peroxide values were highly affected by press cake species. Depending on the raw material, peroxide value was below or above the limit fixed by the codex alimentarius (Codex Alimentarius, 1981). On that basis, only oils produced from linseed and walnut press cakes were of alimentary grade.

Carotenoids were quantified by spectrophotometry (Fig. 5). In oily phases, carotenoids ranged between 0 and 231 mg/kg oil, and the content was highly dependent on the raw material. The hemp extract exhibited content more than tenth time higher than the other press cake extracts. This high value could be due to carotenoids but it could also come from the presence of chlorophylls that interfered in the quantitation. Presence of chlorophylls was evidenced both by the strong green color of F0 and by the absorbance spectrum (Fig. 5). Although chlorophylls absorb at higher wavelengths than carotenoids (600–650 nm instead of 400–500 nm), their residual absorbance at 453 nm will contribute to the carotenoid content as well. Hemp oil is not specially known for high chlorophyll content. According to Matthäus and Brühl, 2008, chlorophylls might sign immature pressed seeds. Indeed, the chlorophyll content of seeds decreases with maturity and fully mature seed are usually devoid of chlorophyll. Chlorophylls

**Fig. 5.** Absorption spectra (for hemp, spectrum is divided by 25).

are lipophilic molecules, so if they are still present in seeds they will be recovered with oil. Regarding carotenoids in the ethanol supernatant, the content ranged from 1 to 45 mg/kg dry extract, with exception of the 1810 mg/kg for hemp. Whatever the cake, carotenoid content of ethanolic phases was higher than that of the oil.

4 Conclusions

In this work, valorization of food industry by-products has been studied through the recovery of lipids from press cakes. SFE with ethanol as co-solvent allowed the recovery of 75 to 98% of the lipids and was highly influenced by the raw

material nature. Although the process used ethanol, the oil phase could be easily separated from the supernatant by decantation. The fatty acid profile of the oil was not affected by the extraction process. Hence, the proposed process could be of interest for efficient de-oiling of press cakes. Moreover, carotenoids and chlorophylls were extracted depending on their presence in the raw material. Although these compounds distributed in both oil and ethanol phases, their extraction showed that pigment-enriched oils could be produced by the process. About economic aspects of SFE, recent studies have highlighted the interest of such a technology for natural product extraction. The investment costs are not notably higher than those of classical extraction plants (Perrut, 2000) and the cost of manufacturing are often highly dependent from raw material cost (Pereira, 2010). In fat and oil transformation, SFE is gaining more and more interest over the years (Temelli, 2009). To conclude on economic viability of press cake CO₂ extraction, a cost analysis should be considered in the future.

Acknowledgements. The financial support of French ANR Project ANR-12-BS09-0006-01 (2012–2015) is greatly acknowledged.

References

- Bozan B, Temelli F. 2002. Supercritical CO₂ extraction of flaxseed. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 79: 231–235.
- Bozan B, Temelli F. 2003. Extraction of poppy seed oil using supercritical CO₂. *J. Food Sci.* 68: 422–426.
- Callaway JC. 2004. Hempseed as a nutritional resource: An overview. *Euphytica* 140: 65–72.
- Catchpole OJ, Tallon SJ, Eltringham WE, et al. 2009. The extraction and fractionation of specialty lipids using near critical fluids. *J. Supercrit. Fluids* 47: 591–597.
- Codex Alimentarius. 1981. Codex Stan 19-1981 – codex standard for edible oils and fats not covered by individual standards, p. 5.
- Corso MP, Fagundes-Klen MR, Silva EA, et al. 2010. Extraction of sesame seed (*Sesamum indicum* L.) oil using compressed propane and supercritical carbon dioxide. *J. Supercrit. Fluids* 52: 56–61.
- Da Porto C, Decorti D, Tubaro F. 2012a. Fatty acid composition and oxidation stability of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil extracted by supercritical carbon dioxide. *Ind. Crops Prod.* 36: 401–404.
- Da Porto C, Voinovich D, Decorti D, Natolino A. 2012b. Response surface optimization of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) oil yield and oxidation stability by supercritical carbon dioxide extraction. *J. Supercrit. Fluids* 68: 45–51.
- Döker O, Salgın U, Yıldız N, Aydoğmuş M, Çalimli A. 2010. Extraction of sesame seed oil using supercritical CO₂ and mathematical modeling. *J. Food Eng.* 97: 360–366.
- Del Valle JM, de la Fuente JC, Uquiche E. 2012. A refined equation for predicting the solubility of vegetable oils in high pressure CO₂. *J. Supercrit. Fluids* 67: 60–70.
- Eggers R. 1996. Supercritical Fluid Extraction (SFE) of oilseeds/lipids in natural products. In: King JW, List GR, Eds. Supercritical fluid technology in oil and lipid chemistry, Champaign (USA): AOCS Press, pp. 35–64.
- Fine F, Albert-Vian M, Fabiano-Tixier AS, Carre P, Pages X, Chemat F. 2013. Les agro-solvants pour l'extraction des huiles végétales issues de graines oléagineuses. *OCL*, 20: A502.
- Folch J, Lees M, Sloane Stanley H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226: 497–509.
- Ivanov DS, Colovic RR, Levic JD, Sredanovic SA. 2012. Optimization of supercritical fluid extraction of linseed oil using RSM. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 114: 807–815.
- Jiao SS, Li D, Huang ZG, et al. 2008. Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of flaxseed oil Using response surface methodology. *Int. J. Food Eng.* 4.
- Johnson LA, Lusas EW. 1983. Comparison of alternative solvents for oils extraction. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 60: 229–242.
- Lichtenthaler HK, Buschman C. 2001. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* F4:F4.3.
- Martínez ML, Mattea MA, Maestri DM. 2008. Pressing and supercritical carbon dioxide extraction of walnut oil. *J. Food Eng.* 88: 399–404.
- Matthäus B, Brühl L. 2008. Virgin Hemp Seed Oil: An Interesting Niche Product. *Eur. J. Lip. Sci. Tech.* 110: 655–661.
- Morin O. Safflower, sesame, camelina, poppy seed oil. In: Karleskind A, Ed. Oils and fats manual, vol. 1. Paris (France): Lavoisier Publishing, 1996a, pp. 148–157.
- Morin O. Almond, hazelnut, walnut. In: Karleskind A, Ed. Oils and fats manual, vol. 1. Paris (France): Lavoisier Publishing, 1996b, pp. 148–157.
- Morrison WR, Smith LM. 1964. Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *J. Lipid. Res.* 5: 600–608.
- Oliveira R, Rodrigues MF, Bernardo-Gil MG. 2002. Characterization and supercritical carbon dioxide extraction of walnut oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 79: 225–230.
- Özkal SG. 2009. Response surface analysis and modeling of flaxseed oil yield in supercritical carbon dioxide. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 86: 1129–1135.
- Pereira CG, Meireles MAA. 2010. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: Fundamentals, applications and economic perspectives. *Food Bioprocess Tech.* 3: 340–372.
- Perrut M. 2000. Supercritical Fluid Applications: Industrial Developments and Economic Issues. *Ind. Eng. Chem. Res.* 39: 4531–4535.
- Przybylski R. Flax oil and high linolenic oils. In: Shahidi F, Ed. Bailey's industrial oil and fat products, vol. 2, 6th ed. Hoboken (USA): John Wiley & Sons, 2005, pp. 281–297.
- Rombaut N. 2013. Étude comparative de trois procédés d'extraction d'huile: aspects qualitatifs et quantitatifs. Application aux graines de lin et aux pépins de raisin. Ph.D. thesis, Université de Technologie de Compiègne (France), 255 p.
- Sahena F, Zaidul ISM, Jinap S, et al. 2009. Application of supercritical CO₂ in lipid extraction – A review. *J. Food Eng.* 95: 240–253.
- Salgın S, Salgın U. 2006. Supercritical fluid extraction of walnut kernel oil. *Eur. J. Lip. Sci. Tech.* 108: 577–582.
- Temelli F. 2009. Perspectives on supercritical fluid processing of fats and oils. *J. Supercrit. Fluids* 47: 583–590.

Phospholipides bio-sourcés riches en acides gras oméga 3 pour la formulation de liposomes

Les liposomes, vésicules à base de phospholipides, sont des systèmes colloïdaux utilisés en recherche et dans différents domaines industriels (pharmaceutique, cosmétique, nutrition). Néanmoins, leur développement se heurte au manque de diversité des sources de phospholipides (soja et jaune d'œuf). Parallèlement, les méthodes industrielles d'extraction des phospholipides sont basées essentiellement sur l'utilisation de solvants organiques. Dans ce contexte, mon sujet de thèse a eu pour but d'étudier l'extraction de PL, par le CO₂ supercritique, à partir de différentes sources avec comme objectif final la formulation de ces PL en liposomes. La démarche a consisté à explorer différents sous-produits de l'huilerie (tourteau d'oléagineux) et de la pêche (sous-produit de la coquille Saint Jacques), potentiellement riches en phospholipides, puis à mettre en place différentes techniques analytiques pour discriminer et quantifier les types de lipides. Parallèlement, l'influence de différents paramètres de l'extraction par CO₂ supercritique sur la pureté des fractions obtenues est abordée ainsi qu'une première approche de formulation de PL en liposomes et la caractérisation de ces vésicules.

Mots clés : Phospholipides, acides gras oméga 3, tourteaux de végétaux, extraction par fluide supercritique, CO₂, éthanol, liposomes, éthosomes.

Naturally occurring phospholipids rich in omega 3 fatty acids for liposome formulation

Liposomes, phospholipids vesicles, are colloidal systems used in search and different industrial fields (pharmaceutical, cosmetic, nutrition). Nevertheless their development face lack of phospholipid sources (soya and egg yolk). At the same time, industrial methods to extract phospholipids use organic solvents. In this context, the phospholipid extraction were studied using a green technology from new different sources in order to formulate liposomes. Oil mill and fishery by-products (seed cake and scallop) were studied to know phospholipid quantities. Analytical techniques were established to discriminate and quantify lipid types. Simultaneously, varying the operating conditions of CO₂ supercritical extraction allowed obtaining extracts with different purities and contents in phospholipids and a first study of liposome formulation was carried out.

Keywords : Phospholipids, omega 3 fatty acids, seed cakes, supercritical fluid extraction, CO₂, ethanol, liposomes, ethosomes.